



NGS в медицинской генетике

Вторая международная научно-практическая конференция

Тезисы конференции

Суздаль
26-28 апреля 2017

Серебряные спонсоры



ThermoFisher
SCIENTIFIC



helicon



Спонсоры



астон
консалтинг



Устные доклады	6
Д01 NGS: что день грядущий нам готовит? <i>А.В. Поляков, О.П. Рыжкова</i>	6
Д02 Опыт использования NGS в диагностике нарушений формирования пола при кариотипе 46,XY <i>Н.Ю. Калинченко, П.М. Рубцов, А.А. Колодкина, Е.В. Васильев, В.М. Петров, А.Н. Тюльпаков</i>	7
Д03 Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий (НИПС) по крови матери: особенности и ограничения метода <i>Е. Шубина, И.Ю. Барков, Л.В. Ким, И.С. Муносей, Т.О. Кочеткова, А.Ю. Гольцов, Н.К. Тетрашвили, О.К. Ступко, Н.А. Каретникова, В.А. Бахарев, Д.Ю. Трофимов</i>	7
Д04 Преимплантационный генетический скрининг методом NGS – неотъемлемый этап к успешной реализации программ ВРТ <i>Ж.И. Глинкина, М.А. Курцер, А.Ю. Высоцкий, И.Д. Троценко</i>	7
Д05 Перспективы использования секвенирования нового поколения для анализа внутриполостной жидкости бластоцисты человека при проведении ПГД <i>Д.И. Жигалина, Н.А. Срябин, О.Р. Канбекова, В. Г. Артюхова, И.Н. Лебедев</i>	8
Д06 In silico анализ патогенности мутаций и перспектива использования глубинного обучения в этой области <i>И. Корвиго, А. Афанасьев, М. Скоблов</i>	9
Д07 Функциональная аннотация несинонимичных однонуклеотидных вариантов, ассоциированных с различными заболеваниями, с помощью моделирования трехмерной структуры соответствующих белков и их комплексов <i>А. Gress, В.Е. Раменский, О.В. Калинина</i>	9
Д08 Opening scientific computing to biology through Galaxy platform <i>А. Nekrutenko</i>	10
Д09 Проблемы, возникающие у врача-генетика при трактовке результатов секвенирования экзома нового поколения <i>Е.Л. Дадали</i>	11
Д10 Как NGS меняет наше представление о корреляциях между фенотипом и генотипом <i>Р. Юсупов, MD</i>	12
Д11 Таргетные панели генов и оценка их эффективности для диагностики наследственных болезней обмена веществ <i>Е.Ю. Захарова, Е.А. Каменец, Ю.С. Иткис, Т.Д. Крылова, Т.Ю. Прошлякова, Н.В. Милованова</i>	12
Д12 NGS в ДНК-диагностике наследственных и врожденных онкозаболеваний <i>В.В. Стрельников, Т.В. Кекева, Е.Б. Кузнецова, М.В. Немцова, М.С. Пациенко, Е.А. Алексева, К.И. Аношкин, К.О. Карандашева, К.И. Кириллова, Д.В. Залетаев, А.С. Танас</i>	13

Д13 NGS в ДНК-диагностике ретинобластомы <i>Е.А. Алексеева, О.В. Бабенко, В.М. Козлова, С.В. Саакян, А.С. Танас, В.В. Стрельников, Д.В. Залетаев.....</i>	14
Д14 Систематическая коррекция проблемы референсных минорных аллелей при аннотации и интерпретации вариантов <i>Ю.А. Барбитов, А.С. Готов, Е.А. Серебрякова, А.В. Предеус.....</i>	15
Д15 Опыт использования NGS для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний <i>Е.В. Заключьминская.....</i>	15
Д16 Hot spot мутации в гене <i>FLNC</i> как причина рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с врожденной миопатией <i>А.М. Киселев, Т.М. Первунина, А.А. Князева, А.А. Худяков, А.А. Ключина, С.И. Тарновская, Т.Л. Вершинина, Е.С. Васичкина, G. Sjoberg, T. Sejersen, А.А. Сергушичев, А.А. Костарева.....</i>	16
Д17 Чего ожидать от NGS в диагностике недифференцированной генетической умственной отсталости? <i>А.В. Лавров, О.А. Левченко, Е.Л. Дадали.....</i>	17
Д18 Полноэкзомное секвенирование в изучении генетических факторов риска болезни Паркинсона <i>М.В. Шульская, М.И. Шадрина, Е.Ю. Федотова, Н.Ю. Абрамычева, С.Н. Иллариошкин, П.А. Сломинский.....</i>	18
Д19 Полногеномное секвенирование ногорты зеленых мартышек как инструмент биомедицинских исследований <i>В.Е. Раменский, А. J. Jasinska, W.C. Warren, S.K. Service, R.K. Wilson, N.B. Freimer.....</i>	19
Д20 Мутации сплайсинга <i>М.Ю. Скоблов, Ю.В. Вяхирева, А.Ю. Филатова.....</i>	19
Д21 Патогенные мутации и генное окружение: современный взгляд на взаимодействия генов в эпоху HTS <i>А.В. Марахонов, М.Ю. Скоблов.....</i>	20
Постерные доклады.....	21
П01 Поиск мутаций в FFPE-образцах ткани РМЖ методом NGS <i>И.С. Абрамов, Ю.С. Корнева, О.А. Шистерова, Т.С. Лисица, М.А. Емельянова, Т.В. Наседкина.....</i>	21
П02 Эффективность диагностики ранних эпилептических энцефалопатий (РРЭ) с помощью секвенирования экзона нового поколения (NGS) <i>И.А. Акимова, Е.Л. Дадали, И.В. Шаркова, Ф.А. Коновалов, Д.В. Пьянков.....</i>	21
П03 Поиск мутаций в гене <i>ATP7B</i> методом массового параллельного секвенирования <i>Г.М. Баязутдинова, А.В. Поляков, О.А. Щагина, В.П. Федотов, Н.В. Вялова.....</i>	22
П04 NGS в пренатальной диагностике <i>Л.А. Бессонова, Е.В. Юдина, Ф.А. Коновалов, В.А. Галкина, Т.Ю. Прошлякова, В.А. Гнетецкая.....</i>	23
П05 Оптимальная стратегия использования технологий NGS для молекулярной диагностики наследственной тугоухости <i>Е.А. Близнач, Т.Г. Маркова, О.Л. Миронович, О.П. Рыжкова, А.В. Поляков.....</i>	23

П06 Оценка эффективности расчета индивидуального генетического риска мультифакториальных заболеваний с применением симулированных выборок <i>О.В. Борисов, Н.А. Кулемин, К.А. Бабалян, И.В. Федюшкина, Э.В. Генерозов.....</i>	24
П07 Анализ альтернативного сплайсинга в глиомах с помощью секвенирования транскриптом <i>А.О. Брагин, Н.В. Губанова, С.С. Ковалев, В.Н. Бабенко, Ю.Л. Орлов.....</i>	25
П08 Особенности распределения мутаций в генах <i>BRCA1/BRCA2</i> у пациенток татарского происхождения с наследственным РМЖ и РЯ, выявляемые методом NGS <i>О.И. Бровкина, М.Г. Гордиев, Р.Ф. Еникеев, М.О. Дружков, Л.Х. Шигапова, Е.И. Шагимарданова, О.А. Гусев, Д.С. Ходырев, А.Г. Никитин.....</i>	25
П09 Компьютерные оценки ошибок коротких прочтений ДНК при высокопроизводительном секвенировании <i>Г.В. Васильев, И.И. Абнизова, Р. те Боекхорст, Э.Р. Галиева, Ю.Л. Орлов.....</i>	26
П10 Скрининг носителей наследственных заболеваний на основе метода MPS (NGS) <i>Р.В. Васильев, С.В. Вяткина, М.А. Стрижова, Н.В. Корнилов, А.Е. Павлов, Т.С. Симакова, А.Г. Брагин, М.А. Глушкова, Ю.А. Внучкова.....</i>	27
П11 Роль герминальной мутации p.F1026L в гене <i>PBRM1</i> при круглоклеточной саркоме мягких тканей <i>И.В. Володин, К.И. Аношкин, В.М. Козлова.....</i>	27
П12 Новая мутация в гене <i>CLN6</i> – основная причина нейронального цероидного липофусциноза 6 типа в Якутии: результаты таргетного экзомного секвенирования <i>П.И. Гурьева, Д.А. Петухова, А.Л. Сухомясова, Е.Е. Гуринова, И.А. Николаева, Р.Н. Иванова, А.А. Кузнецов, В.С. Каймонов, М.Т. Саввина, Н.Р. Максимова.....</i>	28
П13 Мутация в гене <i>KIAA2022</i> как причина эпилепсии и задержки психомоторного, речевого и интеллектуального развития у девочки <i>С.С. Жилина, Т.В. Кожанова, Т.И. Мещерякова, Н.П. Прокопьева, К.В. Осипова, С.О. Айвазян, И.В. Канивец, Ф.А. Коновалов, Е.Р. Толмачева, Ф.А. Кошкин, А.Г. Притыко.....</i>	29
П14 Острые лейкозы с перестройкой гена <i>KMT2A</i> у детей. Определение редких вариантов перестроек с использованием высокопроизводительного секвенирования <i>Е.А. Зеркаленкова, А.Н. Казанова, К. Мейер, А.В. Панферова, Н.М. Тимофеева, Е.В. Апрелова, О.И. Солдаткина, П.Б. Барышев, Ю.Ю. Чекменева, Г.А. Цаур, Р. Маршалек, М.А. Масчан, А.А. Масчан, Ю.В. Ольшанская.....</i>	30
П15 Выявление редких химерных транскриптов в лейкоэмических клетках с помощью секвенирования транскриптома <i>А.Ю. Иконникова, Ю.И. Амму, А.В. Снежина, Г.С. Краснов, А.В. Кудрявцева, Т.В. Наседкина.....</i>	30
П16 Влияние ошибок картирования прочтений NGS на спектр аллельных частот выявляемых вариантов <i>К.О. Карандашева, А.С. Танас.....</i>	31
П17 Разработка метода выявления клинически значимых структурных вариантов в генах <i>BRCA1</i> и с использованием массового параллельного секвенирования в образцах ДНК, выделенной из крови и гистологических блоков <i>А.А. Кечин, У.А. Боярских, Н.А. Ермоленко, Е.А. Храпов, А.С. Тюляндина, Д.Г. Лазарева, М.Л. Филипенко.....</i>	32

П18 Система детекции клональных перестроек иммуноглобулиновых генов для анализа минимальной остаточной болезни при терапии острых лимфобластных лейкозов <i>А.Ю. Комнов, А.М. Мирошниченкова, А.А. Минервина, Г.А. Нугманов, Ю.Б. Лебедев, И.З. Мамедов, Ю.В. Ольшанская, М.А. Масчан</i>	32
П19 Биоинформатическая предобработка геномных данных полученных на различных платформах для последующего совместного использования в ассоциативных и индивидуальных исследованиях <i>Н.А. Кулемин, О.В. Борисов, К.А. Бабалян, Э.В. Генерозов</i>	33
П20 Случай первичной аутосомно-рецессивной микроцефалии в Карачаево-Черкессии <i>А.Х. Макаев, А.В. Марахонов, Т.А. Васильева, Е.Е. Тимковская, В.А. Галкина, Е.Л. Дадали, Р.А. Зинченко</i>	34
П21 Поиск мутаций при синдроме Марфана на основе метода массового параллельного секвенирования <i>О.Л. Миронович, О.П. Рыжкова, А.Н. Семячкина, А.В. Поляков</i>	35
П22 Роль NGS в преимплантационной диагностике (ПГД) хромосомных и моногенных нарушений у эмбрионов, полученных при ЭКО <i>Е.В. Мусатова, Я.В. Софронова, Е.А. Померанцева</i>	35
П23 Молекулярно-генетическая характеристика ОМЛ с t(8;21) у детей <i>А.В. Паңферова, М.В. Гаськова, Н.М. Тимофеева, О.И. Солдаткина, Ю.Ю. Чеменева, Е.А. Зеркаленкова, А.Н. Казакова, И.И. Калинина, Ю.В. Ольшанская, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан, А.А. Масчан</i>	36
П24 Опыт применения комплексной молекулярно-генетической диагностики нейрофиброматоза <i>М.С. Пащенко, Е.Б. Кузнецова, А.С. Танас, Л.А. Бессонова, Г.Н. Матющенко, Н.А. Демина, В.А. Галкина, М.С. Петухова, И.В. Анисимова, Д.В. Залетаев, В.В. Стрельников</i>	37
П25 Анализ мутаций в гене EGFR в циркулирующей ДНК крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого <i>Е.Е. Писарева, Е.В. Горностаева, С.П. Коваленко, В.А. Шаманин</i>	38
П26 Поиск герминальных мутаций в генах SDHX при каротидных хеMODEKТОМАХ методом высокопроизводительного секвенирования <i>А.В. Снежкина, Д.В. Калинин, А.Р. Зарецкий, А.Л. Головкин, М.С. Федорова, Е.А. Жевелюк, О.А. Степанов, Г.С. Краснов, А.В. Кудрявцева</i>	39
П27 Молекулярно-генетические основы семейных аденом гипофиза (АГ) <i>Т.С. Тарасова, Е.А. Пигарова, Л.К. Дзеранова, А.Н. Тюльпаков, И.И. Дедов</i>	40
П28 Часто встречаемые мутации в генах саркомерных белков у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией из Беларуси <i>Н.Н. Чанова, С.С. Ниязова, С.М. Комиссарова</i>	40
П29 Анализ спектра мутаций в гене PАН методом NGS у новорожденных с положительными результатами неонатального скрининга на фенилкетонурию <i>Ю.А. Чурюмова</i>	41

П30 Выявление генетических полиморфизмов, связанных с наследственной мигренью в семье татарского происхождения <i>Е.И. Шагмарданова, Е.Г. Менделевич, С.Ф. Хайбуллина, Е.В. Мартынова, А.А. Ризванов, А.В. Никитин, О.А. Гусев, Р.А. Гиниатуллин</i>	41
П31 Пример диагностики редких моногенных синдромов с помощью секвенирования экзона нового поколения (NGS) <i>И.В. Шаркова, Е.Л. Дадали, И.А. Акимова, Ф.А. Коновалов, И.В. Канивец</i>	42
П32 Генетические особенности BRCA1-2 не ассоциированного наследственного рака молочной железы/ рака яичников у женщин с татарским этносом <i>Л.Х. Шигапова, Я.А. Лексина, М.Г. Гордиев, Р.Ф. Еникеев, А.Г. Никитин, Е.И. Шагмарданова, О.А. Гусев</i>	43
Опубликованные тезисы	45
T01 Роль NGS в мониторинге микробиома респираторного тракта больных муковисцидозом <i>О.Л. Воронина, Н.Н. Рыжова, М.С. Кунда, Е.И. Аксенова, Н.Е. Шарапова, Е.Л. Амелина, А.Г. Чучалин, А.Л. Гинцбург</i>	45
T02 Наследственная спастическая параплегия в выборке российских пациентов <i>В.А. Кадникова, О.П. Рыжкова, Г.Е. Руденская, А.В. Поляков</i>	45
T03 Разработка экспериментальных методик высокопроизводительного секвенирования древней ДНК и методов анализа данных <i>А.Д. Мацвай, И.Э. Альборова, Е.В. Пимкина, М.Л. Маркелов, К.Ф. Хафизов, Х.Х. Мустафин</i>	46
T04 Использование полноэкзомного секвенирования в ДНК-диагностике первичной цилиарной дискинезии <i>С.А. Руднева, Е.Е. Брагина, В.Б. Черных</i>	47
T05 Опыт применения NGS-секвенатора Genereader Qiagen в клинико-исследовательской практике для выявления соматических мутаций <i>В.М. Сафронова, А.В. Коровкина, Т.В. Тимошенко, Л.Н. Любченко</i>	48
T06 Особенности применения технологии NGS в HLA-типировании как первый шаг к успешной трансплантации ГСК <i>О.А. Шрагина, В.В. Захарова, Е.В. Райкина</i>	48
Авторский указатель	50

УСТНЫЕ ДОКЛАДЫ

Д01

NGS: что день грядущий нам готовит?

А.В. Поляков^{*}, О.П. Рыжкова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

*apol@dnalab.ru

В докладе рассмотрены число и размер генов, приводящих к наследственным заболеваниям, скорость накопления этих данных, размеры и другие характеристики экзомных панелей различных производителей. Обсуждаются вопросы применимости данных, а также кастомных панелей для решения задач практической ДНК-диагностики. Оценивается востребованность панелей различного размера в зависимости от генетической гетерогенности заболевания. Кратко представлены собственные результаты.

Д02

Опыт использования NGS в диагностике нарушений формирования пола при кариотипе 46,XY

Н.Ю. Калинин¹, П.М. Рубцов², А.А. Колодкина¹, Е.В. Васильев¹, В.М. Петров¹, А.Н. Тюльпаков^{1*}

¹ ФГБУ Эндокринологический научный центр МЗ РФ, Москва

² Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва

*genes@endocrincentr.ru

Цели: анализ молекулярной основы нарушений формирования пола (НФП) 46,XY с использованием NGS.

Методы. Обследовано 168 пациентов с НФП 46,XY. Секвенирование проводилось на секвенаторе PGM с использованием оригинальной таргетной панели Ion AmpliSeq™ для анализа 45 генов. У 1 пациента дополнительно проведено полноэкзомное секвенирование на секвенаторе Ion Proton. Для вторичной биоинформатической обработки данных использовался пакет ANNOVAR.

Результаты. У 92 пациентов обнаружены изменения нуклеотидной последовательности, классифицированные как патогенные, вероятно патогенные или варианты с неизвестной значимостью. Наиболее часто определялись мутации в генах *AR* (n=20), *NR5A1* (n=14) и *AMH* (n=6). В группе с дефектами *NR5A1* выявлено сочетание НФП 46,XY с надпочечниковой недостаточностью, обусловленное ранее неописанной мутацией G35D. Среди «редких» генов-кандидатов можно отметить несколько уникальных наблюдений, в том числе, случай дисгенезии гонад, ассоциированный с ранее неописанной гомозиготной мутацией в гене *DMRT1*, а также вариант НФП 46,XY вследствие компаунд-гетерозиготной мутации в гене *CYB5A*. В результате полноэкзомного секвенирования у ребенка с фенотипом неполной формы резистентности к андрогенам выявлен новый ген-кандидат на хромосоме 19.

Выводы. Дефекты гена *NR5A1* оказались второй по частоте встречаемости причиной НФП 46,XY в обследованной когорте больных. NGS является эффективным способом при проведении молекулярно-генетического обследования у пациентов с НФП 46,XY, однако возможности интерпретации вариантов в редких генах-кандидатах являются пока ограниченными.

Д03

Неинвазивный пренатальный ДНК-скрининг анеуплоидий (НИПС) по крови матери: особенности и ограничения метода

Е. Шубина^{*}, И.Ю. Барков, Л.В. Ким, И.С. Мукосей, Т.О. Кочеткова, А.Ю. Гольцов, Н.К. Тетруашвили, О.К. Ступко, Н.А. Каретникова, В.А. Бахарев, Д.Ю. Трофимов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр акушерства гинекологии и перинатологии им. В.И.Кулакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

*jekaterina.shubina@gmail.com

Мотивация и цели. С 2011 года для скрининга анеуплоидий плода применяется неинвазивный тест, основанный на секвенировании внеклеточной ДНК в плазме крови беременной женщины, в которой помимо ДНК матери содержится 5-15% ДНК плода. Широкомасштабные клинические исследования показали высокую чувствительность и специфичность метода. В данной работе представлен опыт применения НИПС в рамках научно-исследовательской работы в НЦАГиП им. В.И. Кулакова и проиллюстрирован ряд биологических ограничений метода.

Методы. Неинвазивный пренатальный ДНК скрининг проводили с использованием технологии высокопроизводительного секвенирования Ion Torrent (S5, Proton) и разработанного авторами алгоритма анализа данных. Всего был проанализирован 801 образец на сроках 10-20 недель.

Результаты. Большинство подходов к неинвазивному скринингу не различают материнскую и плодовую ДНК. В связи с этим могут возникать ложноположительные результаты неинвазивного скрининга, связанные с не диагностированными анеуплоидиями у матери, чаще всего в мозаичной форме и по X хромосоме. Нами было обнаружено 4 случая (0.5%) анеуплоидии у матери: 1 трисомии по X хромосоме и 3 моносомии по X хромосоме в мозаичной форме. В редких случаях анеуплоидные клетки возникают не в процессе образования яйцеклетки или сперматозоида, а в одном из первых делений после образования зиготы. Авторам известно об одном ложноотрицательном результате исследования по 21 хромосоме, связанном с наличием у плода трех клеточных линий с 1ой, 2-мя и 3-мя копиями 21 хромосомы.

Заключение. Вышеперечисленные примеры демонстрируют биологические ограничения метода, подчеркивают необходимость проведения инвазивных процедур для подтверждения положительных результатов скрининга и медико-генетического консультирования для разъяснения ограничений и особенностей метода.

Д04

Преимплантационный генетический скрининг методом NGS – неотъемлемый этап к успешной реализации программ ВРТ

Ж.И. Глинкина^{*}, М.А. Курцер, А.Ю. Высоцкий, И.Д. Троценко

Перинатальный Медицинский Центр «Мать и дитя»

*Janna435@yandex.ru

Доказано, что применение скрининга эмбрионов в программе ВРТ, повышает в разы эффективность программы ВРТ. Так же известно, что процент повышения эффективности зависит от метода исследования и количества исследуемых хромосом.

Цель: определить структуру и частоту хромосомных нарушений у эмбрионов, полученных в программе ЭКО.

Методы: высокопроизводительное секвенирование (NGS).

Результаты: всего секвенированием было проанализировано 1450 эмбрионов у 483 женщин, средний возраст ко-

торых составлял 36,7 лет (± 6 лет). При анализе эмбрионов патологические изменения были обнаружены в 62,8% случаев. В 51,6% случаях патология была выявлена по одной хромосоме, в 23,5% патология была выявлена по двум хромосомам. Частота патологических изменений более 2 хромосом была статистически значимо выше в возрастной группе старше 40 лет по сравнению с группой до 35 лет ($p=0,04$). Наиболее часто патологические изменения наблюдались по 15, 16, 21 и 22 хромосомам. В возрастной группе старше 40 лет частота мозаицизма была статистически значимо ниже по сравнению с группами до 35 и 35-40 лет ($p<0,01$), а частота трисомий в старшей возрастной группе была наиболее высокой.

Заключение: Выявленные хромосомные аномалии у эмбрионов указывают на то, что ПГС должен стать неотъемлемой частью программы ВРТ, так как может повысить эффективность программы в разы и является хорошим профилактическим мероприятием по рождению ребенка с генетической патологией.

Д05

Перспективы использования секвенирования нового поколения для анализа внутриполостной жидкости бластоцисты человека при проведении ПГД

Д.И. Жигалина^{1*}, Н.А. Скрябин^{1,2}, О.Р. Канбекова³, В. Г. Артюхова⁴, И.Н. Лебедев^{1,2}

¹ Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Российская Федерация

² Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский НИМЦ, Томск, Российская Федерация

³ ОГАУЗ «Областной перинатальный центр», Томск, Российская Федерация

⁴ Красноярский центр репродуктивной медицины, Красноярск, Российская Федерация

*darya.zhigalina@medgenetics.ru

Мотивация и цели. Наличие хромосомного мозаицизма осложняет определение кариотипа эмбриона при проведении преимплантационной генетической диагностики. Молекулярное кариотипирование ДНК из внутриполостной жидкости бластоцисты дает возможность получить дополнительную информацию о хромосомной конституции эмбриона. Целью настоящей работы стал сравнительный анализ ДНК из полости бластоцисты, эмбриобласта (ЭБ) и трофэктодермы (ТЭ) с помощью aCGH и NGS.

Методы. Проанализировано 7 бластоцист человека на 5 день развития. Эмбрионы были получены на основании добровольного информированного согласия пациентов после проведения циклов ЭКО. Для каждой бластоцисты производилась биопсия внутриполостной жидкости, разделение и забор ЭБ и ТЭ. Образцы анализировались с использованием набора VeriSeq™ PGSKit - MiSeq® System (Illumina). Биоинформационная обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения BlueFuse Multi Software (Illumina).

Результаты. С помощью aCGH нами предварительно был проведен анализ 15 бластоцист. Из них для 7 анеуплоидных эмбрионов мы использовали NGS. Результаты aCGH и NGS полностью совпали лишь у одного эмбриона (14,2%). В остальных 6 случаях NGS позволило выявить дополнительные анеуплоидии, которые составили 33,3% (23/69) от общего числа обнаруженных хромосомных аномалий. Что касается жидкости из полости бластоцисты, то с помощью aCGH во всех обследованных образцах было выявлено 16 анеуплоидий, тогда как при использовании NGS этот показатель вырос на 43% (28 анеуплоидий). Более того, по результатам aCGH хромосомный мозаицизм с наличием двух и более различных анеуплоидий был выявлен в тканях 43% бластоцист (3/7), тогда как после NGS частота мозаичных эмбрионов возросла до 71% (5/7).

Заключение. Использование NGS может повысить вероятность детекции анеуплоидий и хромосомного мозаицизма при проведении ПГД в сочетании с традиционно используемыми источниками биологического материала.

Д06

In silico анализ патогенности мутаций и перспектива использования глубинного обучения в этой области

И. Корвиго^{*}, А. Афанасьев, М. Скоблов

Лаборатория функционального анализа генома, Московский физико-технический институт, 117303, Москва, ул. Черенская, д. 1А, корп. 1

*ilia.korvigo@gmail.com

Популяризация геномных технологий, вызванная резким падением стоимости секвенирования ДНК, затронула в том числе область анализа каузативных мутаций, давая доступ к огромному количеству генетической информации. С другой стороны, работа медицинских генетиков затрудняется поиском среди всего множества естественных вариантов, выявляемых в геноме любого человека, патогенных. Классические молекулярно-биологические методы не обладают достаточной производительностью для проверки всех неописанных прежде вариантов, поэтому были разработаны специальные модели для *in silico* приоритизации замен с последующей лабораторной валидацией. С момента создания первого подобного инструмента появились многие десятки альтернатив, некоторые из которых привнесли в область совершенно новые идеи. В последнее время, из-за аккумуляции достаточно больших массивов данных, стали разрабатываться модели, основанные на глубинном обучении (глубоких искусственных нейронных сетях), обещающие значительно повысить охват и точность предсказания. Изучив устройство нескольких десятков популярных инструментов, мы составили список основных подходов, используемых для предсказания фенотипического эффекта нуклеотидных замен в геноме человека и других млекопитающих. Большая часть этих подходов основана на извлечении различной информации из первичных последовательностей ДНК и белков, при объединении которой для предсказания патогенности применяются разнообразные алгоритмы машинного обучения, в частности логистическая регрессия, опорные векторы и Байесовские модели. Поскольку в проблемах машинного обучения критическую роль играет структура и состав обучающей и тестовой выборки, мы обращали особое внимание на источники данных, используемых при обучении и тестировании моделей. В конечном итоге мы подготовили всеобъемлющий обзор популярных инструментов для автоматического анализа фенотипического проявления несинонимичных замен, оценив их производительность в терминах покрытия экзона человека, чувствительности и специфичности. Эти знания позволили нам разработать собственные модели, использующие современные методы глубинного обучения, превосходящие по точности и покрытию доступные альтернативы. Для удобного доступа к результатам нашей работы мы разработали бесплатный веб-сервис (<http://score.generesearch.ru>), с помощью которого любой желающий может провести анализ своих данных и быстро получить результат.

Д07

Функциональная аннотация несинонимичных одонуклеотидных вариантов, ассоциированных с различными заболеваниями, с помощью моделирования трехмерной структуры соответствующих белков и их комплексов

A. Gress^{1,2}, В.Е. Раменский^{3,4,5}, О.В. Калинина^{1*}

¹ Department for Computational Biology and Applied Algorithmics, Max Planck Institute for Informatics, Saarland Informatics Campus, Building E1.4, 66123 Saarbrücken, Germany.

² Graduate School of Computer Science, Saarland University, Campus E1.3, 66123 Saarbrücken, Germany.

³ Center for Neurobehavioral Genetics, University of California, Los Angeles, 695 Charles E. Young Drive South, Los Angeles, CA 90095, USA.

⁴ Московский Физико-Технический Институт, Институтский переулок, 9, 141701, г. Долгопрудный, Московская область, Россия.

⁵ Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта, ул. А. Невского, 14, 236016, г. Калининград, Россия

*kalinina@mpi-inf.mpg.de

Мотивация и цели. Однонуклеотидные варианты (single-nucleotide variants, SNVs) — основной тип генетических вариантов, наблюдаемых в геномах разных индивидуумов. Большинство из них функционально-нейтральны, однако небольшая часть может стать причиной различных генетических заболеваний, включая рак. Задача данной работы — среди однонуклеотидных вариантов, ассоциированных с определенными заболеваниями и вносящих мутации в последовательность соответствующих белков (несинонимичных, nsSNVs) выделить те, которые могут существенно повлиять на структуру и функцию этих белков, и таким образом, являться причиной заболеваний.

Методы. Мы рассматриваем наиболее полный набор nsSNVs: ассоциированные с раком nsSNVs из ClinVar, COSMIC и UniProt, ассоциированные с другими генетическими заболеваниями из ClinVar и UniProt, частые полиморфизмы из ExAC и безвредные из ClinVar. С помощью сравнения последовательностей соответствующих белков мы моделируем пространственное положение аминокислот, соответствующих nsSNV, в комплексах белков с другими белками, низкомолекулярными лигандами и нуклеиновыми кислотами, и их положение в белковой глобуле.

Результаты. Был разработан алгоритм, реализованный в виде свободно доступного через интернет веб-сервиса StructMAN (<http://structman.mpi-inf.mpg.de/>). С его помощью мы показали, что около 50% мутаций, соответствующих частым и безвредным nsSNVs, лежат на поверхности белка и, вероятно, функционально нейтральны, тогда как более 75% мутаций, соответствующих nsSNVs, ассоциированным с различными заболеваниями лежат внутри белковой глобулы или на поверхности взаимодействия белка с другими молекулами. При этом варианты, ассоциированные с раком чаще лежат на поверхности взаимодействия с другими макромолекулами или в сайтах связывания лигандов, а варианты, ассоциированные с нераковыми заболеваниями чаще лежат внутри белка и, вероятно, дестабилизируют его структуру.

Заключение. Представленный подход является новым перспективным методом для предсказания функциональной роли nsSNVs.

Д08

Opening scientific computing to biology through Galaxy platform

А. Nekrutenko*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center for Comparative Genomics and Bioinformatics, The Galaxy Project, Penn State University

*anton@bx.psu.edu

Due to the rapidly increasing volume of biological data from sequencing, imaging, and other technologies, data processing needs in the Life Sciences are now on par with physical, mathematical, and engineering disciplines. Importantly, the distributed nature of data generation in biology makes this situation even more challenging. Today one can hardly find a research institution without multiple high-throughput sequencing machines, and we often hear about a «data crisis» in biology. National agencies, (such as NSF in the USA or CNRS in France) are investing heavily in cyberinfrastructure by supporting development of high performance computing (HPC) resources. Yet to a large extent these resources remain unknown to biological researchers who overwhelmingly continue to rely on fragile in-house computation. Simply advertising these systems to the biological community is unlikely to change this situation: Big Data is new to Life Sciences and most researchers do not possess the skills required for effective utilization of HPC systems. In this presentation I will demonstrate how this problem can be solved using Galaxy system developed in my group.

The Galaxy project (<http://galaxyproject.org>) started in 2005 to create a system enabling biologists without informatics expertise to perform computational analysis through the web. Existing analysis tools are defined to

Galaxy with wrappers that describe tool behavior and which are then used to generate a consistent user interface. Multi-step analyses can be performed by running tools in succession, and Galaxy preserves the complete provenance of each analysis step in a history. By bridging the gap between tool developers and researchers, Galaxy helps both constituencies accelerate their research. The project has several components:

1. The Galaxy software framework: Galaxy is an open-source application (distributed under the permissive Academic Free License; <http://getgalaxy.org>) that can be deployed on any Unix system. In addition to the aforementioned tool integration and history capabilities, it includes a workflow system for building automated multi-step analyses, a visualization framework including visual analysis capabilities, and facilities for sharing and publishing analyses. The Galaxy software is highly customizable and integrates with a wide variety of compute environments ranging from laptop computers to clusters to compute clouds.

2. The Public Galaxy Service: The main Galaxy site at <http://usegalaxy.org> is an installation of the Galaxy software combined with many common tools and data; this site has been available since 2007 for anyone to analyze their data free of charge. The site provides substantial CPU and disk space, making it possible to analyze large datasets. The site supports thousands of users and hundreds of thousands of jobs per month (<http://bit.ly/gxystats>). It is sustained by TACC hardware using allocation generously provided by the CyVerse project.

3. The Galaxy ToolShed: Major challenges arose as Galaxy became widely deployed: 1) it wasn't easy for tool developers and Galaxy administrators to share and Galaxy tool definitions and 2) it was difficult for administrators to install tools and dependencies, and to maintain appropriate versions to ensure reproducibility. The ToolShed addresses these challenges by providing a central location where tool developers can upload tool configurations and «recipes» describing how to install dependencies. A Galaxy instance administrator can then install a tool and all necessary dependencies in an entirely automated way through the Galaxy Web interface or API.

4. The Galaxy Community: Finally, one of the most important project components is the Galaxy community, consisting of several constituencies. First, {the user community}, who we support through outreach and training activities including both carrying out training directly and developing training materials. Second, {the developer community}, consisting both of tool developers who we support through the development of the ToolShed, and contributors to the Galaxy framework itself whom we support through reviewing and merging pull requests (additions and modifications to the source code submitted to us through the version control system) to the main Galaxy code. Third, {the Galaxy administrator community}, consisting of systems administrators maintaining Galaxy instances, who we support through the development of automation tools for deploying and maintaining Galaxy. Importantly, our team provides direct support for all these groups by answering questions of all sorts through our BioStar question and answer forum, our mailing lists, and our IRC channel. Finally, to facilitate regular face-to-face communication between these groups, we organize a yearly conference (the Galaxy Community Conference), and have begun to organize Galaxy Hackathons for developers (bit.ly/gxyEvents).

Д09

Проблемы, возникающие у врача-генетика при трактовке результатов секвенирования экзона нового поколения

Е.Л. Дадали*

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

*genclinic@yandex.ru

Мотивация и цели. Использование результатов секвенирования экзона в практической работе врача-генетика позволило существенно повысить эффективность медико-генетического консультирования, так как дало возможность проводить диагностику отдельных вариантов генетически гетерогенных групп заболеваний, сходных по клиническим проявлениям. Однако при трактовке результатов проведения секвенирования экзона врачом-генетиком возникает ряд проблем, которые требуют обсуждения.

Материалы и методы. Проведен анализ результатов секвенирования экзома 220 больных с эписиндромом.

Результаты исследования. Показано, что основными проблемами при трактовке результатов являются следующие:

- 1.Существование нескольких аллельных вариантов, различающихся по тяжести клинических проявлений, обусловленных мутациями в одном гене.
- 2.Неполная пенетрантность и варьирующая экспрессивность гена, ответственного за возникновение АД заболевания, приводящие к отсутствию или наличию минимальных клинических проявлений.
- 3.Наличие гонадного мозаицизма, уровень которого не известен, в связи с чем, возникают трудности при расчете повторного риска возникновения заболевания в отягощенной семье.
- 4.Обнаружение ранее не описанных нуклеотидных замен, функциональная значимость которых не известна.
- 5.Обнаружение мутации в гетерозиготном состоянии в гене, ответственном за аутосомно-рецессивное заболевание, клинические проявления которого сходны с таковыми у больного. В этом случае можно предполагать, что вторая мутация находится глубоко в интроне или является делецией участка хромосомы.

Заключение. При трактовке результатов секвенирования экзома врачом-генетиком необходимо особенностей необходимо провести сбор генеалогических данных, особенностей клинических проявлений и результатов параклинических обследований больного и анализ литературных данных.

Д10

Как NGS меняет наше представление о корреляциях между фенотипом и генотипом

Р. Юсупов*, MD

¹ Division of clinical genetics, Department of Neuroscience, Joe DiMaggio Children Hospital, Hollywood, Florida, USA
*ryusupov@mhs.net

С появлением новых технологий в области генетики и геномики, в частности NGS, стало возможным быстрее, экономически эффективней, и многограннее исследовать возможные генетические дефекты. Однако проблема понимания взаимосвязей между генотипом и фенотипом стала гораздо более сложной при огромном навалу генетической информации, получаемой с помощью NGS. Эта информация усложняет не только нашу способность понимать полигенные болезни, но и наше понимание моногенных признаков уже не совсем такое каким оно было раньше. Результаты многих клинических и научных исследований опровергли устоявшуюся догму 1 ген = 1 синдром и фенотипическая изменчивость некоторых заболеваний была продемонстрирована разнообразными наследственными механизмами. Чем больше генетической гетерогенности выявляется с помощью следующего поколения секвенирования тем более сложнее становится понять генотипные/фенотипные отношения. Огромное количество данных получаемых научными исследованиями и клиническим секвенированием немного устаревает, но при правильном подходе их использование может улучшить клинические исходы.

Д11

Таргетные панели генов и оценка их эффективности для диагностики наследственных болезней обмена веществ

Е.Ю. Захарова*, Е.А. Каменец, Ю.С. Иткис, Т.Д. Крылова, Т.Ю. Прошлякова, Н.В. Милованова

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»
*labnbo@yandex.ru

Мотивация и цели. Наследственные болезни обмена веществ (НБО) – обширный класс моногенных заболеваний человека. Известно более 700 нозологических форм, каждая из которых встречается довольно редко в попу-

ляции. Многие из НБО имеют схожие клинические проявления, и без применения специальных лабораторных тестов дифференцировать их бывает сложно. Технологии секвенирования нового поколения прочно заняли лидирующее место в диагностике наследственных заболеваний человека, НБО не исключение. Несмотря на большой арсенал биохимических методов, которые возможен применять для диагностики НБО, молекулярно-генетические исследования для этих заболеваний иногда становятся определяющими в установлении диагноза.

Методы. NGS проводили на приборах IonTorrent PGM, Ion S5 по протоколам производителя (ThermoFisher Scientific).

Результаты. В лаборатории НБОВ ФГБНУ «МГНЦ» были разработаны уникальные таргетные панели: панель «НБО», включающая 203 гена; панель «Лейкодистрофии/лейкоэнцефалопатии» – 59 генов; панель «Митохондриальные болезни, мутации ядерного генома» – 62 гена, панель «НБО с поражением печени, гликогенозы» – 47 генов, панель «Наследственные болезни с патологией скелета» – 123 гена. В общем потоке пациентов наибольшую эффективность показала панель для заболеваний печени, в 36% случаев удалось установить диагноз.

Заключение. В рамках доклада будут обсуждаться несколько возможных сценариев диагностики НБО с применением NGS. Будут обсуждаться результаты анализа более 500 образцов на 5 разных таргетных панелях с оценкой эффективности данного метода диагностики; применение NGS в качестве метода подтверждения диагноза для НБО на примере органических ацидурий; и, конечно, уникальные и неожиданные находки, которые расширяют наше представление о клинических фенотипах НБО.

Д12

NGS в ДНК-диагностике наследственных и врожденных онкозаболеваний

В.В. Стрельников^{1,2*}, Т.В. Кекеева^{1,3}, Е.Б. Кузнецова^{1,4}, М.В. Немцова^{1,4}, М.С. Пащенко¹, Е.А. Алексеева^{1,4}, К.И. Аношкин^{1,2}, К.О. Карандашева², К.И. Кириллова¹, Д.В. Залетаев^{1,2,4}, А.С. Танас^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1

² Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1;

³ ФГАУ Лечебно-реабилитационный центр Минздрава России, Москва, 125367, Ивановское ш., д.3

⁴ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

*vstrel@list.ru

Цель: совершенствование ДНК-диагностики наследственных и врожденных онкологических заболеваний.

Методы. Разработка и внедрение протоколов комплексной ДНК-диагностики наследственных и врожденных онкологических заболеваний на основе NGS с использованием, при необходимости, дополнительных методов ДНК-диагностики. Формирование библиотек фрагментов генома, содержащих кодирующие последовательности генов и прилежащие интронные участки, проводили с использованием технологии AmpliSeq по протоколам и на приборах Thermo Fisher Scientific. Секвенирование проводили на приборах Ion Torrent PGM и Ion S5 (Thermo Fisher Scientific) по протоколам производителя. Основные дополнительные методы ДНК-диагностики – секвенирование ДНК по Сэнгеру (валидация мутаций, выявленных NGS, генетическое тестирование родственников), MLPA (выявление нарушений копийности участков ДНК в пределах исследуемых генов).

Результаты. Разработаны и/или внедрены в практику ФГБНУ «МГНЦ» NGS-панели для выявления герминальных мутаций у больных раком молочной железы / яичников (гены *BRCA1*, *BRCA2*), раком желудка (*CDH1*), синдромом Ли-Фраумени (*TP53*), синдромом Пейтца-Егерса (*STK11*), ювенильным гастро-интестинальным полипозом (*SMAD4*, *BMPR1A*), ретинобластомой (*RB1*), туберозным склерозом (*TSC1*, *TSC2*), синдромом Коудена (*PTEN*), нейрофиброматозом (*NF1*, *NF2*). NGS-панели представляют собой наборы из 1-4 пулов праймеров, обеспечи-

вающие секвенирование всех кодирующих последовательностей и прилежащих интронных областей генов. В состав панелей входит от 1 до 6 генов.

Заключение. Внедрение панелей NGS в практику поиска мутаций в генах наследственных и врождённых форм онкологических заболеваний значительно сократило сроки и повысило качество выполнения ДНК-диагностики. Средний срок проведения анализа сокращен до 1 месяца. Повышение качества ДНК-диагностики достигается, в частности, высокой чувствительностью NGS в отношении минорных мутантных клонов и эффективной фильтрацией последовательностей псевдогенов на этапе выравнивания прочитанных последовательностей на полный референсный геном.

Д13 NGS в ДНК-диагностике ретинобластомы

Е.А. Алексеева^{1,2*}, О.В. Бабенко¹, В.М. Козлова³, С.В. Саакян⁴, А.С. Танас^{1,5}, В.В. Стрельников^{1,5}, Д.В. Залетаев^{1,2,5}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, 115478, ул. Москворечье, д.1

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Трубецкая, д.8, стр.2

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения, Москва, 115478, Каширское шоссе, д. 23

⁴ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения, Москва, 105062, ул. Садовая-Черногрязская, д. 14/19

⁵ Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 117997, ул. Островитянова, д.1

*ekater.alekseeva@gmail.com

Введение. Текущий подход для определения мутаций в гене *RB1*, ответственного за развитие ретинобластомы, – секвенирование по Сэнгеру – является высокоэффективным, однако из-за отсутствия «горячих» точек и значительной протяженности гена трудоемким и продолжительным по времени.

Цель. Оптимизация и повышение эффективности существующей молекулярно-генетической диагностики ретинобластомы.

Материалы и методы. Исследован 41 пациент с ретинобластомой. Формирование библиотек фрагментов генома, содержащих кодирующие последовательности генов и прилежащие интронные участки, проводили с использованием технологии AmpliSeq по протоколам и на приборах Thermo Fisher Scientific. Секвенирование проводили на приборах Ion Torrent PGM и Ion S5 (Thermo Fisher Scientific) по протоколам производителя. С целью валидации выявленных мутаций применяли метод секвенирования по Сэнгеру.

Результаты. Частоты и характер структурных повреждений, выявленных в гене *RB1*, представлены в таблице. В одном случае выявлена мозаичная мутация.

Нонсенс	Миссенс	Мутации сдвига рамки	Мутации сайтов сплайсинга
34,1%	9,8%	4,9%	14,6%

Заключение. Использование NGS в молекулярно-генетической диагностике позволяет выявить весь спектр мутаций в гене *RB1* у пациентов с ретинобластомой с высокой эффективностью и за более короткое время. Кроме того, использование секвенирования нового поколения позволяет выявлять мозаичные варианты мутаций, что часто затруднено при использовании секвенирования по Сэнгеру.

Д14 Систематическая коррекция проблемы референсных минорных аллелей при аннотации и интерпретации вариантов

Ю.А. Барбитов^{1,2,3*}, А.С. Глотов², Е.А. Серебрякова², А.В. Предеус¹

¹ Институт Биоинформатики, Санкт-Петербург, Россия

² РЦ «Центр Биобанк» Научного Парка СПбГУ, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

³ Кафедра генетики и биотехнологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
*barbitoff@bk.ru

Мотивация и цели. Референсная сборка генома человека, используемая практически во всех клинических исследованиях, содержит большое количество позиций, в которых референсная аллель является редкой и/или известной патогенной. Несмотря на то, что данная проблема была описана ранее, до сих пор не предложено методов простой и эффективной борьбы с ней. В этой работе мы сосредоточились на выявлении и коррекции всех негативных эффектов референсных минорных аллелей на определение и интерпретацию вариантов.

Методы. В качестве референсных минорных аллелей (PMA) рассматривались варианты, имеющие частоту нереперенсной аллели больше 0,5 в базах данных 1000 Genomes, Exome Aggregation Consortium и ESP6500. Для аннотации эффекта референсных минорных аллелей замены были аннотированы при помощи программ SIFT, Polyphen2 и PROVEAN.

Результаты. В рамках данной работы было выявлено 14325 позиций в кодирующих последовательностях референсного генома, в которых референсная аллель является минорной, причем в 5666 случаях замена PMA на мажорную аллель приводила к замене аминокислоты. Мы обнаружили, что предсказания эффекта таких замен программами SIFT, PROVEAN и Polyphen2, предоставляемыми веб-серверами или базой dbNSFP, являют собой «обратные предсказания», т.е. предсказания эффекта замены мутантной аминокислоты на аминокислоту дикого типа. Также мы выявили 11403 вариантов, функциональный эффект которых аннотируется неправильно ввиду наличия PMA в том же кодоне. Среди таких вариантов были обнаружены 1239 нонсенс-мутаций, мисаннотируемых как несинонимичные или синонимичные замены. Для исправления потенциальных ошибок, вызванных наличием PMA в геноме, была разработана интуитивно понятная программа «RMAHunter» (rmahunter.bioinf.me), призванная предоставить правильную информацию обо всех PMA и соседствующих с ними вариантах в VCF-файле.

Заключение. Систематическая коррекция референсных минорных аллелей может улучшить точность интерпретации вариантов в клинической практике.

Работа по созданию биобанка поддержана грантом РНФ №14-50-00069 и выполнена на базе РЦ «Биобанк» Научного Парка СПбГУ.

Д15 Опыт использования NGS для диагностики сердечно-сосудистых заболеваний

Е.В. Заклязьминская*

ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского»

*zhelene@mail.ru

Введение. Методы NGS всё шире используются для диагностики наследственных заболеваний, однако валидация результатов, показания к назначению, выбор метода и списка генов, схемы консультирования по результатам ещё требуют всестороннего обсуждения. Больные с сердечно-сосудистыми заболеваниями составляют значительную часть приёма врача-генетика, и зачастую обращаются как для первичного подтверждения диагноза,

так и для интерпретации уже выполненных результатов исследования. Капиллярное секвенирование и полупроводниковое секвенирование с использованием набора праймеров AmpliSeq, как и все ПЦР-опосредованные методы, имеют сходные ограничения по качеству диагностики, в том числе, потерю гетерозиготности вследствие Избирательной амплификации одного из аллелей при наличии полиморфизмов в 3'-области праймера.

Методы. В лаборатории медицинской генетики проводится секвенирование панелей генов на платформе IonTorrent с использованием пулов праймеров AmpliSeq. Дизайн и синтез праймеров выполняется фирмой-производителем (ThermoFisher). Верификация потенциально клинически значимых вариантов и всех областей, покрытых с низким качеством, осуществляется при помощи двунаправленного капиллярного секвенирования по Сенгеру. Пациентам с предполагаемым диагнозом моногенного заболевания с небольшим числом известных генов выполняется секвенирование по Сенгеру целевых генов.

Результаты. В лаборатории используются целевые панели для поиска мутаций в генах, ответственных за наиболее частые варианты наследственных аритмий (11 генов, 30kb, 234 пары праймеров), дисплазий соединительной ткани (14 генов, 39kb, 342 пары праймеров), аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка (16 генов, 94kb, 521 пара праймеров). Мы провели секвенирование образцов ДНК для 160 больных на хотя бы одной панели. Было выявлено 5 случаев потери аллелей в 5 образцах ДНК. Один аллель был «потерян» при секвенировании на панели AmpliSeq (1/160, 0.6%) и выявлен при контрольном секвенировании по Сенгеру. В 4 образцах панели AmpliSeq выявили SNP, «потерянные» при предыдущем секвенировании по Сенгеру (4/160, 2.4%) и ранее считавшихся «нормальными гомозиготами». Таким образом, мы выявили по меньшей мере один случай потери гетерозиготности в 3.1% образцов ДНК при комбинации двух методов. Все случаи потери гетерозиготности были обнаружены случайно, при потере гетерозиготности по сцепленному маркерному полиморфизму, локализованному в том же ампликоне.

Заключение. Очевидно, что при секвенировании, которое включает комбинацию двух ПЦР-опосредованных методов, в подавляющем числе ампликонов мы не имели «маркерных» полиморфизмов, по которым могли бы судить о феномене потери гетерозиготности. Поэтому высоко вероятно, что его частота при использовании только одного метода гораздо выше, при этом вероятность растёт с увеличением размера панели и используемых пар праймеров. Мы считаем, что секвенирование протяженных ПЦР-продуктов с двух независимых пар праймеров остаётся «золотым стандартом» ДНК-диагностики, хотя и очень длительным и дорогостоящим. Увеличение числа генов в диагностической панели за счет включения малоизученных генов представляет несомненный научный интерес, но ведёт к увеличению себестоимости собственно ДНК-диагностики, призванной решать клинические задачи, и увеличивает риск ложно-отрицательных результатов.

Д16

Hot spot мутации в гене *FLNC* как причина рестриктивной кардиомиопатии, ассоциированной с врожденной миопатией

А.М. Киселев, Т.М. Первунина, А.А. Князева, А.А. Худяков, А.А. Ключина, С.И. Тарновская, Т.Л. Вершинина, Е.С. Васичкина, G. Sjoberg, T. Sejersen, А.А. Сергушичев, А.А. Костарева*

*akostareva@hotmail.com

Введение: Ген филамин С изначально был описан в связи с развитием миофибриллярной и дистальной миопатий, которые проявляются в возрасте 30-40 лет. Недавно мутации в гене *FLNC* были описаны в качестве причины развития различных типов кардиомиопатий. В частности, было показано, что мутации *FLNC* могут являться причинами развития рестриктивной кардиомиопатии (РКМП) – наиболее редкого и малоизученного типа кардиомиопатий. В связи с редкостью РКМП, а также недавним описанием данного гена в качестве причины патологии сердечно-сосудистой системы распространенность мутаций *FLNC* и клинические особенности течения филаминовых кардиомиопатий, в частности, среди детей с РКМП, неизвестна.

Материалы и методы. Работа была одобрена локальным этическим комитетом, от имени детей, вовлеченных в исследование, было получено письменное информированное согласие ближайших родственников. В исследовании были включены 17 детей с идиопатической РКМП; дети с врожденными нарушениями метаболизма и такими врожденными синдромами, как синдром Нунан не включались в исследование. Генотипирование проводилось с использованием панели для целевого обогащения HaloPlex при помощи прибора MiSeq (Illumina). Для пациентов с негативным результатом после целевого секвенирования проводили экзомное секвенирование. Патогенность миссенс-мутаций оценивали методом предикций MetaSVM, полученных на основании данных dbNSFP. Идентифицированные генетические варианты были классифицированы согласно методическим рекомендациям ACMG.

Результаты. Средний возраст дебюта РКМП в исследуемой группе составлял 7.6±5.8 лет, у пяти пациентов диагноз РКМП был установлен в течение первого года жизни. Нами были показано наличие двух мутаций в гене *FLNC* у 4 пациентов из 17 – A1186V у трех пробандов и A1183V у одного пробанда. У двух пациентов был подтвержден de novo характер мутации. В оставшихся двух семьях родители отказались от проведения генетического анализа. Выявленные замены локализируются в десятом Ig-подобном повторе филамина С, ранее не описанном в связи с развитием кардиомиопатий. Во всех описанных случаях рестриктивная кардиомиопатия сочеталась с миопатией, что было подтверждено неврологическим обследованием, электромиографией и морфологическим исследованием скелетных мышц. У трех пациентов врожденный артрогрипоз сопровождался мышечной слабостью и умеренным повышением уровня креатинкиназы в плазме, у двух пациентов были зафиксированы вовлечение центральной нервной системы и нейропатия. Умеренные признаки мышечной слабости были выявлены у всех четырех пациентов на первом году жизни, диагноз РКМП был установлен в возрасте до двух лет для всех пациентов. У всех детей с РКМП, ассоциированной с мутациями в гене *FLNC*, симптомы сердечной недостаточности являлись главной причиной осложнений и госпитализации с умеренной прогрессией миопатического синдрома в течение 3-5 лет.

Заключение. Среди пациентов детского возраста с РКМП мутации в гене *FLNC* были выявлены в 23% случаев. Среди детей с идиопатической РКМП, проявившейся в первый год жизни, мутации в гене *FLNC* составили 60% (3 из 5). A1186V мутация в гене филамина С ассоциирована с ранним развитием РКМП с сопутствующим врожденным артрогрипозом и миопатией.

Д17

Чего ожидать от NGS в диагностике недифференцированной генетической умственной отсталости?

А.В. Лавров^{1,2*}, О.А. Левченко¹, Е.Л. Дадали¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Россия, 115478, Москва, Москворечье, 1

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, Москва

*avlavrov@yandex.ru

Умственная отсталость встречается по разным оценкам у 1-3% населения. Клинически принято классифицировать умственную отсталость по тяжести, однако нозологическая классификация до сих пор остается нерешенной задачей. До 50% случаев умственной отсталости являются результатом генетических нарушений на хромосомном или геномном уровне. Встречаются все возможные варианты генетических нарушений – хромосомные, аутосомно-доминантные, аутосомно-рецессивные, X-сцепленные и многофакторные. Для многих из них описана специфическая клиническая картина, что позволяет врачам назначать прицельные исследования кариотипа или отдельных генов. Однако для большинства форм так называемой изолированной недифференцированной

умственной отсталости клинически невозможно заподозрить конкретную генетическую причину, т.к. у пациента отмечаются минимальные и неспецифические изменения фенотипа. В такой ситуации необходимо проводить полноэкзомный анализ, т.к. число уже известных генов, мутации в которых приводят к умственной отсталости, превышает 1500, и по всей видимости ещё несколько сотен генов могут пополнить этот список в будущем. По данным нескольких крупных исследований умственной отсталости с использованием полноэкзомного и полногеномного секвенирования диагностическая ценность NGS различается в зависимости от подходов к формированию выборок пациентов и колеблется от 16% при экзомном анализе до 62% при геномном анализе. Но не только клинические аспекты влияют на эффективность NGS анализа, но и технические особенности используемой платформы. Что общего и чем отличаются наиболее распространённые готовые решения для таргетного высокопроизводительного секвенирования? Эти и другие молекулярно-генетические и клинические аспекты NGS диагностики умственной отсталости будут рассмотрены в докладе.

Д18

Полноэкзомное секвенирование в изучении генетических факторов риска болезни Паркинсона

М.В. Шульская^{1*}, М.И. Шадрин¹, Е.Ю. Федотова², Н.Ю. Абрамычева², С.Н. Иллариошкин², П.А. Сломинский¹

¹ Институт молекулярной генетики Российской академии наук, 123182 Москва, Россия

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», 125367 Москва, Россия

*m.shulskaya@gmail.com

Мотивация и цели. Болезнь Паркинсона (БП) – многофакторное нейродегенеративное заболевание с выраженным генетическим компонентом, для которого характерно существование как семейных, так и спорадических форм. Анализ семейных форм БП выявил целый ряд генов, мутации в которых приводят к развитию заболевания. Однако известные гены и описанные в них мутации не могут объяснить все наблюдаемые случаи БП. В связи с этим целью работы является идентификация новых генетических факторов, вовлеченных в патогенез БП с использованием технологии полноэкзомного NGS секвенирования.

Методы. На платформе Illumina HiSeq 2500 было проведено полноэкзомное NGS секвенирование ДНК 48 пациентов с исключенными частыми мутациями и предполагаемой аутосомно-доминантной формой БП. Оценку полученных данных проводили с использованием баз данных dbSNP версии 137, проекта «1000 геномов» и проекта по секвенированию экзона (ESP), а также пакетов программ SIFT, Polyphen-2, FATHMM, MutationAssessor и MutationTaster.

Результаты. В ходе обработки данных выявлялось большое количество ложноположительных гетерозигот. Для их отсева был разработан специальный алгоритм, учитывающий глубину прочтения и соотношение частот аллелей. В итоге для дальнейшего анализа было отобрано 186 SNV в различных генах, проведена оценка их возможной патогенетической значимости и вовлеченности в патогенез БП с использованием современных интегрированных пакетов программ CADD, REVEL, а также базы данных PathwayStudio. У трех пациентов были выявлены редкие миссенс-замены в известных генах БП (*LRRK2*, *PARK2*, *GBA*), также была выявлена миссенс-замена в гене *PSEN1*, описанная ранее в семье с болезнью Альцгеймера с паркинсонизмом.

Заключение. Полноэкзомное секвенирование позволяет выявлять большое количество редких однонуклеотидных замен, однако в настоящее время точная однозначная оценка их патогенетичности при сложных многофакторных заболеваниях, таких как БП, невозможна имеющимися биоинформатическими методами.

Д19

Полногеномное секвенирование когорты зеленых марьяшек как инструмент биомедицинских исследований

В.Е. Раменский^{1,4,5*}, А.Ж. Jasinska^{1,2}, W.C. Warren³, S.K. Service¹, R.K. Wilson⁴, N.B. Freimer¹

¹ Center for Neurobehavioral Genetics, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095, USA

² Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland

³ McDonnell Genome Institute, Washington University School of Medicine, St Louis, MO 63108, USA

⁴ Московский Физико-Технический Институт, Институтский переулок, 9, 141701, г. Долгопрудный, Московская область, Россия

⁵ Балтийский Федеральный Университет им. И. Канта, ул. А. Невского, 14, 236016, г. Калининград, Россия

*ramensky@gmail.com

Мотивация и цели. Африканские зеленые марьяшки (верветки) широко используются в биомедицинских исследованиях для изучения строения мозга, поведения, метаболизма и иммунной системы приматов. Подобные исследования опираются на информацию о структуре и вариативности генома.

Методы. Был получен референсный геном верветки и проведено полногеномное секвенирование 719 обезьян из исследовательского центра Vervet Research Colony. Для большинства обезьян из этой когорты доступна комплексная фенотипическая информация: продолжительность жизни, заболевания, информация о рождаемости и пр. В ходе обработки данных был разработан подход к интегрированию данных из геномов, секвенированных с различным покрытием.

Результаты. Нами был охарактеризован наблюдаемый спектр однонуклеотидных вариантов и коротких вставок и удалений фрагментов генома (инделов) в секвенированных обезьянах. В первую очередь интерес представляют варианты, наиболее вероятно приводящие к потере функции белка (loss-of-function): инделы в кодирующих экзонах, мутации в сайтах сплайсинга и мутации, приводящие к появлению стоп-кодона. Путем поиска таких вариантов, специфичных для групп обезьян, были предложены новые кандидатные гены для таких фенотипов, как высокая смертность новорожденных, катаракта, брадикардия, нарушения обмена веществ. Были определены частоты трансмиссии аллелей loss-of-function вариантов в трио и найдены «уязвимые» гены, избегающие мутаций в обеих копиях. Мы также проанализировали фенотипы обезьян, являющихся носителями болезнетворных несинонимичных мутаций человека из базы данных ClinVar, с целью поиска сходных фенотипических проявлений.

Заключение. Данный проект является на сегодняшний день наиболее полной попыткой охарактеризовать вариативность генома приматов и показать, как полученные геномные данные транслируются в прикладные биомедицинские исследования.

Д20

Мутации сплайсинга

М.Ю. Скоблов^{1,2*}, Ю.В. Вяхирева¹, А.Ю. Филатова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный

*mskoblov@generesearch.ru

Диагностика моногенных заболеваний с помощью NGS за последние годы стала более эффективной. При этом для большинства случаев до сих пор не удаётся выявить причину патогенеза, и наоборот, находится много кандидатных вариантов из которых очень сложно определить реально патогенный. Мутации, приводящие к изменению сплайсинга, зачастую имеют очень чёткий патогенный эффект, при этом их не так просто идентифицировать. Связано это с тем, что в прохождении и регуляции сплайсинга участвует много белков, и они могут

связываться со сплайсируемой РНК в любой её части: как в самих экзонах, так и глубоко в интронах. Программы, предсказывающие патогенность таких замен, работают очень слабо. Поэтому, резюмируя выше сказанное, при анализе необходимо помнить о таких заменах и уделять им особенное внимание, а при нахождении проводить функциональный анализ таких мутаций для подтверждения их патогенности.

Д21

Патогенные мутации и генное окружение: современный взгляд на взаимодействия генов в эпоху HTS

А.В. Марахонов^{1,2*}, М.Ю. Скоблов^{1,2}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² Московский физико-технический институт, Долгопрудный

*marakhonov@generesearch.ru

Под менделирующими заболеваниями обычно понимают состояния, вызываемые мутациями в одном гене. Однако, различия в генетическом фоне (бэкграунде) могут довольно существенно изменять фенотип даже при наличии одной и той же патогенной мутации, что было показано в ряде работ на модельных организмах: мышах, дрозофиле, дрожжах. Становится все более очевидным, что даже с учетом действия факторов окружающей среды, одна и та же мутация у пациентов с наследственной патологией может приводить к существенной гетерогенности клинической картины, что затрудняет анализ гено-фенотипических корреляций и усложняет предсказание течения заболевания у разных пациентов.

Вплоть до последнего времени, анализ влияния генетического фона мог быть проведен для ограниченного количества генов-модификаторов. Однако, даже эти исследования показали, что схожий генотип в исследуемых локусах может определять серьезную гетерогенность в экспрессивности патогенной мутации. Исходя из принципа универсальности генетического фона, существует большая вероятность того, что каждая первичная патогенная мутация будет испытывать воздействия целого набора генетических вариантов, определяющих генетический фон, при этом, каждый раз уникальный для любого индивида.

В настоящее время описаны ряд примеров использования технологий широкомасштабного секвенирования, в том числе на модельных организмах, которые позволили охарактеризовать вклад генетического фона в экспрессивность патогенных мутаций. Были описаны детальные механизмы как межгенного, так и внутригенного взаимодействия аллелей, что открывает новые перспективы для диагностики наследственных заболеваний, объяснения гетерогенности фенотипических проявлений генетических изменений, а также разработки терапевтических подходов.

ПОСТЕРНЫЕ ДОКЛАДЫ

П01

Поиск мутаций в FFPE-образцах ткани РМЖ методом NGS

И.С. Абрамов^{1,2*}, Ю.С. Корнева^{3,4}, О.А. Шистерова⁵, Т.С. Лисица¹, М.А. Емельянова¹, Т.В. Наседкина¹

¹ Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН

² ФГБУ «РОНЦ им. Н. Н. Блохина» МЗ РФ

³ ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ

⁴ ОГБУЗ «Смоленский областной институт патологии»

⁵ ОГБУЗ «Смоленский областной онкологический клинический диспансер»

*abriv@bk.ru

Мотивация и цели. Рак молочной железы (РМЖ) является ведущей онкологической патологией у женщин. Для данного заболевания описаны генетические нарушения, которые влияют на клинико-морфологические характеристики опухоли. Также в опухолевых клетках возникают соматические мутации, которые могут приводить к снижению эффективности терапии и, как следствие, уменьшению общей и безрецидивной выживаемости.

Методы. В настоящем исследовании мы использовали метод таргетного массового параллельного секвенирования (NGS) для анализа мутаций в 12 образцах ДНК РМЖ пациентов молодого возраста, с тройным негативным подтипом, выделенных из ткани, фиксированной формалином и залитой в парафин. Секвенирование проводили на платформе MiSeq (Illumina). Для отбора целевых последовательностей генов *APC*, *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDH1*, *CDH3*, *CDK4*, *CHEK2*, *MET*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *MUTYH*, *NBN*, *PALB2*, *PMS2*, *PTEN*, *RET*, *STK11*, *TP53*, *VHL* использовали жидкий чип Nimblegen (Roche) (custom panel).

Результаты. Проведено секвенирование со средним покрытием 1000x, что позволяет детектировать как герминальные мутации, так и соматические нарушения в опухолевых клетках. В двух образцах были обнаружены патогенные герминальные мутации в гене *BRCA1* (185delAG, 3347delAG), в одном образце – в гене *BRCA2* (886delGT). Также были найдены патогенные соматические мутации в генах *MSH6* (3261delC), *MUTYH* (734G>A) и *TP53* (с.637C>T, с.733G>A).

Заключение. Секвенирование на платформе MiSeq с пробоподготовкой Nimblegen (Roche) эффективно при поиске патогенных мутаций, влияющих на фенотип опухоли. В дальнейшем данные секвенирования могут быть использованы при разработке и оптимизации панелей маркеров для рутинной диагностики.

П02

Эффективность диагностики ранних эпилептических энцефалопатий (РЭЭ) с помощью секвенирования экзона нового поколения (NGS)

И.А. Акимова^{1*}, Е.Л. Дадали¹, И.В. Шаркова¹, Ф.А. Коновалов², Д.В. Пьянков²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² Лаборатория «Геномед», Москва

*akimova@geno-med.ru

Мотивация и цели. Не менее 70% всех заболеваний, сопровождающихся судорогами, имеют моногенную природу. Клинические проявления и тяжесть течения наследственных эпилепсий варьируемы. Описаны варианты с доброкачественным и злокачественным течением. Наиболее тяжелое течение, характеризующееся фармако-резистентностью судорожных приступов, наблюдается в группе РЭЭ. Выраженная генетическая гетерогенность

этой группы заболеваний при значительном сходстве их клинических проявлений, обуславливает целесообразность проведения NGS для диагностики отдельных генетических вариантов РЭЭ с использованием панелей генов, ответственных за возникновение заболеваний, сопровождающихся судорожным синдромом. Целью настоящего исследования является оценка эффективности «эпилептической панели», разработанной в клинике «Геномед», и включающей 560 генов.

Материалы и методы исследования. NGS осуществлялось на платформе IlluminaNextSeq 500 с применением методики таргетного обогащения ДНК TruSightOne V1.1. Проведено исследование 110 больным с направляющим диагнозом РЭЭ.

Результаты. В результате проведенного анализа у 84 больных (76,3%) диагностирован определенный генетический вариант РЭЭ. Наибольшее количество случаев (48,8%) было обусловлено мутациями в гене *SCN1A*, ответственного за возникновение РЭЭ 6 типа. Диагностировано 8 случаев РЭЭ 9 типа, обусловленных мутациями в гене *PCDH19*, 7 случаев РЭЭ 4 типа с мутациями в гене *KCNQ2*, 6 случаев РЭЭ 13 типа с мутациями в гене *SCN8A*, 5 случаев РЭЭ 11 типа с мутациями в гене *SCN2A*, по 4 случая РЭЭ 2 и 7 типов с мутациями в генах *CDKL5* и *STXBP1*. Лишь у единственных больных выявлены мутации в генах *ARX*, *SLC25A22*, *SPTAN1*, *KCNT1*, *TBC1D24*, *GRIN2B*, *DNM1*, *ALG13* и *CACNA1A*, ответственных за возникновение РЭЭ 1, 3, 5, 14, 16, 27, 31, 36 и 42 типов, соответственно.

Заключение. Результаты исследования соответствуют полученным в ряде крупнейших лабораторий мира, и свидетельствуют об эффективности предложенной панели для диагностики наследственных вариантов РЭЭ.

П03

Поиск мутаций в гене *ATP7B* методом массового параллельного секвенирования

Г.М. Баязутдинова^{1*}, А.В. Поляков¹, О.А. Щагина¹, В.П. Федотов², Н.В. Вялова³

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

² БУЗ ВО «ВОКБ №1», Воронеж, Россия

³ Дальневосточный государственный медицинский университет, Хабаровск, Россия

*Rainbow4282@yandex.ru

Введение. Болезнь Вильсона-Коновалова (БВК) – тяжелое аутосомно-рецессивное заболевание, обусловленное избыточным накоплением в организме и токсическим воздействием меди. К возникновению БВК приводят мутации в гене *ATP7B*, локализованном в области 13q14.3. Для данного заболевания существует этиотропная специфическая терапия.

Цель работы. Целью работы явился поиск мутаций в гене *ATP7B* в выборке российских больных.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили образцы ДНК 50 больных с ранее выявленной разнообразными методами одной мутацией в гене *ATP7B*. Поиск мутаций осуществлялся с помощью метода массового параллельного секвенирования всей кодирующей последовательности и областей экзон-интронных соединений гена *ATP7B* на платформе 454 Sequencing (Roche). Особенность системы состоит в наличии этапа проверки качества библиотеки с помощью фрагментного анализа.

Результаты и обсуждение. В результате обнаружены мутации на 79 хромосомах. Из них 11 мутаций – инсерции/делеции, остальные – точечные замены. Ранее найденные частые мутации нашли свое подтверждение методом NGS. Все вновь найденные мутации подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру. Мутация с.2304insC была выявлена в результате анализа bam-файлов, так как не отображалась в VCF, вероятно из-за того, что находится в области гомополимера. В результате данной работы было выявлено шесть неописанных патогенных вариантов в гене *ATP7B*.

Заключение. Все ранее выявленные другими методами мутации были подтверждены с помощью NGS системы. Вторая мутация в гене *ATP7B* выявлена у 29 пробандов.

П04

NGS в пренатальной диагностике

Л.А. Бессонова^{1,2*}, Е.В. Юдина², Ф.А. Коновалов^{1,3}, В.А. Галкина¹, Т.Ю. Прошлякова¹, В.А. Гнетецкая²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² Медико-генетический центр группы компаний «Мать и дитя», Москва

³ Медико-генетический центр ООО «Геномед», Москва

*bessonova_la@mail.ru

Мотивация и цели. Во многих случаях множественных врожденных пороков развития (МВПР) после исключения хромосомной патологии причина остается неизвестной. Консультирование подобных семей по прогнозу потомства представляет большие трудности. Предполагается высокая эффективность NGS в пренатальной диагностике.

Методы. 3 семьям с повторными МВПР после исключения хромосомной и микрохромосомной патологии (аCGH), предложено NGS на ДНК плода выделенной из пуповинной крови или материале вскрытия после прерывания беременности. Клиническое секвенирование экзона проводилось на секвенаторе Illumina NextSeq 500 методом парно-концевого чтения (2x151 п.о.) со средним покрытием 70-100x. Результаты подтверждены секвенированием по Сэнгеру. У плодов обнаруженные мутации определены в гомозиготном или компаунд-гетерозиготном состоянии, у родителей в гетерозиготном.

Результаты. В 1-й семье (родители четвероюродные сибсы) с повторным случаем двустороннего укорочения и искривления бедренных костей у плода, обнаружена мутация с.1348C>T в гомозиготном состоянии в гене *ALPL*, ранее описанная при врожденной форме гипофосфатазии (ОМIM: 241500). Во 2-й семье 3 беременности с МВПР (неиммунная водянка плода, многоводие, микроретрогнатия, акинезия плода, артрогрипоз) – при исследовании обнаружены ранее описанная p.149del15 и неописанная p.149del15 мутации в гене *RAPSN*, ответственном за развитие синдрома Пены-Шокейра тип I (ОМIM: 208150). В 3-й семье с повторным случаем скелетной дисплазии (укорочение конечностей, гипоплазия лобных костей, плоский профиль, экзофтальм, расщелина неба и губы), обнаружены ранее неописанные мутации с.1019_1021dupTCC/c.164G>A в гене *FAM20C*, ответственном за развитие синдрома Рейна (ОМIM: 259775, неонатальная остеосклеротическая дисплазия костей).

Заключение. Применение NGS позволило установить точный диагноз и определить дальнейший прогноз потомства, а также предложить семьям с высоким риском рецессивного заболевания проведение дородовой или преимплантационной диагностики.

П05

Оптимальная стратегия использования технологий NGS для молекулярной диагностики наследственной тугоухости

Е.А. Близнец^{1*}, Т.Г. Маркова², О.Л. Миронович¹, О.П. Рыжкова¹, А.В. Поляков¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² ФГБУН «Российский Научно-Практический Центр аудиологии и слухопротезирования ФМБА», Москва

*bliznetzelena@mail.ru

Проблема своевременной диагностики врожденной тугоухости не теряет свою актуальность в связи с возможностями ранней реабилитации. По данным, полученным при проведении универсального аудиологического скрининга, в России распространенность врожденного нарушения слуха составляет 3 на 1000 новорожденных. Согласно молекулярно-генетическим исследованиям до трети выявленных случаев представляют собой на-

следственную несиндромальную форму тугоухости генетического типа DFNB1, обусловленную рецессивными мутациями в одном гене *GJB2*. Помимо упомянутого гена на сегодняшний день известны еще более 60 генов, связанных с несиндромальной тугоухостью, и более 100 генов – с различными синдромами с нарушением слуха. При отсутствии мутаций у пациента с тугоухостью в гене *GJB2* или при наличии классической клинической картины частого синдрома наиболее информативным способом поиска молекулярного дефекта являются методы NGS экзона или генома. В связи с дороговизной данных методов и сложностью интерпретации полученных результатов, сегодня широко применяется более дешевое и простое NGS панелей нескольких десятков или сотен генов, связанных с заболеванием. В мире разработано много разных NGS панелей генов тугоухости. Однако в связи с постоянным обновлением данных полноэкзомных и полногеномных исследований, существующие панели генов уже устарели и характеризуются низким отношением информативности/цена. Мы сформировали новый список генов для исследования тугоухих пациентов методом NGS, основываясь как на результатах анализа существующих панелей генов зарубежными специалистами, так и на результатах NGS экзомов зарубежных и российских больных. Полученная панель включает 35 генов, ответственных за несиндромальную и/или синдромальную тугоухость. Информативность диагностики при использовании NGS данной панели ожидается более 60% для пациентов с несиндромальной тугоухостью без мутаций в гене *GJB2*, учитывая данные публикаций. Также NGS указанной панели удобна для молекулярной диагностики наиболее частых синдромальных форм нарушения слуха. Для оценки реальной информативности NGS данной панели в настоящее время мы проводим дополнительное исследование.

П06

Оценка эффективности расчета индивидуального генетического риска мультифакториальных заболеваний с применением симулированных выборок

О.В. Борисов*, Н.А. Кулемин, К.А. Бабалян, И.В. Федюшкина, Э.В. Генерозов

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

*olegbor77@yandex.ru

Мотивация и цели. Развитие высокопроизводительного секвенирования и доступность получаемых генетических данных делают возможным создание многокомпонентных моделей для оценки генетического риска. Проверка работоспособности таких моделей на практике требует значительных средств. Альтернативой этому служат подходы, основанные на создании (симуляции) искусственных генетических выборок для расчета апостериорного риска заболеваний с использованием теоремы Байеса. Цель работы – оценка эффективности данного метода в применении к данным экзомного секвенирования.

Методы. Симуляция генетических выборок и моделирование рисков выполнены на основе метода, предложенного Janssens et al. (PubMed ID 16845271). Для расчета отношений правдоподобия (LR) использована информация о 3492 нуклеотидных вариантах, ассоциированных с 32 патологическими состояниями по данным каталога GWAS (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>). Симуляция генотипов произведена для 100.000 индивидов. На основе полученных моделей выполнен расчет совокупного генетического риска развития заболеваний на экспериментальных данных, полученных в ходе секвенирования 50 экзомов. Ожидаемая диагностическая точность модели оценивалась с помощью ROC-анализа.

Результаты. В ходе построения генетических выборок были получены отношения правдоподобия и апостериорные вероятности каждого из генотипов симулированных образцов. Показатели диагностической точности, оцениваемые как площадь под характеристической кривой (AUC), изменялись в пределах от 0,62 до 0,98. Применение полученных моделей к экзомным данным позволило рассчитать индивидуальный риск заболевания каждого из исследованных людей. Количественно риск выражался в виде апостериорной вероятности со значениями от 0 до 1 и определялся соответствующим генетическим профилем.

Заключение. Полученные результаты показали высокий потенциал возможностей метода построения искус-

ственных выборок для расчета индивидуального риска развития мультифакториальных заболеваний на основе генетического профиля.

Данная работа поддержана Российским научным фондом (номер гранта 17-15-01436)

П07

Анализ альтернативного сплайсинга в глиомах с помощью секвенирования транскриптом

А.О. Брагин¹, Н.В. Губанова^{1,2}, С.С. Ковалев³, В.Н. Бабенко², Ю.Л. Орлов^{1,2*}

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет (НГУ), г. Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск, Россия

*orlov@bionet.nsc.ru

Для определения полногеномного спектра изменений экспрессии генов в первичных культурах клеток глиом и нормального мозга проведён эксперимент по анализу транскриптом (RNA-Seq). Рассмотрены по 3 библиотеки транскриптомов глиом и нормального мозга (более чем 20 млн. прочтений каждая). Анализ внутренних контролей ERCC Spike-In Mix показал отсутствие искажений представленности при приготовлении библиотек и секвенировании. При сравнении тканей глиомы со здоровой тканью были найдены более восьми тысяч случаев дифференциальной экспрессии. Дифференциально экспрессирующиеся гены были сверхпредставлены в процессах, связанных с межклеточным взаимодействием, клеточной гибелью, метаболизмом в клетке, что подтверждает связь с раковыми заболеваниями. Дифференциальную экспрессию имели егг комплекса ядерной поры.

На основе анализа базы данных OMIM и литературы выявлено 73 дифференциально экспрессирующихся гена, которые опосредуют развитие глиомы. Выявлено более 18000 случаев альтернативного сплайсинга, из них для 123 генов имеются подтверждения в литературе об их роли в развитии глиомы. При анализе дифференциального сплайсинга были выявлены достоверные различия профилей сплайсинга в трех генах, связанных с возможной пролиферацией, между клетками нормального мозга и глиобластомы: белок-прекурсор амилоида бета APP (amyloid beta precursor protein), ген предрасположенности к раку *CASC4* (cancer susceptibility candidate 4) и известный онкоген – транскрипционный фактор *TP53*. В частности, в гене *TP53* наблюдалась некодирующая изоформа NR_015381 с достоверно большей частотой в клетках глиобластомы. Для *TP53* весь спектр (37 видимых на наших данных изоформ из 43 известных) изоформ, наблюдаемых в клетках глиобластом, отличался по уровню экспрессии от изоформ в нормальных клетках мозга. В частности, некодирующая изоформа NR_015381 относится только к клеткам глиобластом.

Работа поддержана РФФИ и бюджетным проектом ИЦиГ СО РАН (0324-2016-0008).

П08

Особенности распределения мутаций в генах *BRCA1/BRCA2* у пациенток татарского происхождения с наследственным РМЖ и РЯ, выявляемые методом NGS

О.И. Бровкина^{1*}, М.Г. Гордиев², Р.Ф. Еникеев², М.О. Дружков², Л.Х. Шигапова³, Е.И. Шагимарданова³, О.А. Гусев³, Д.С. Ходырев¹, А.Г. Никитин¹

¹ Федеральный научно-клинический центр ФМБА России (г. Москва)

² ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер МЗ РТ» (г. Казань)

³ Казанский (Приволжский) федеральный университет (г.Казань), RIKEN (Йокогама, Япония)

*brov.olia@gmail.com

Мотивация и цели. В лабораторию поступил образец крови пациентки А, сестра которой в раннем возрасте (12 лет) умерла от круглоклеточной саркомы мягких тканей. Семейный анамнез не позволял определить в данной семье тот или иной наследственный опухолевый синдром, поэтому было назначено высокопроизводительное параллельное секвенирование 409 генов, вовлеченных в канцерогенез. По результатам исследования у пациентки была выявлена редкая герминальная мутация p.F1026L в гене *PBRM1*, на тот момент не описанная в базах данных и имеющая противоречивые оценки патогенности от биоинформатических предикторов. Несмотря на имеющиеся сведения о вовлеченности данного гена в онкогенез, информации о его изменениях при данной нозологии не найдено. В связи с этим было решено провести исследование для выявления возможной патогенной роли данной мутации.

Материалы и методы. NGS проводили с использованием набора праймеров Comprehensive Cancer Panel, Ion AmpliSeq, на приборе Ion Torrent PGM. Для валидации мутации, определения линии её наследования и исследования дисбаланса экспрессии аллелей использовалось прямое секвенирование по Сэнгеру опухолевой ДНК и кДНК.

Результаты. Ген *PBRM1* является онкосупрессором, поэтому доказательством патогенности мутации в нем может служить утрата нормального аллеля или потеря экспрессии нормального аллеля в ткани опухоли. Исходя из этого, были выполнены следующие исследования:

- 1) поиск потери нормального аллеля на уровне ДНК,
- 2) поиск дисбаланса экспрессии нормального и мутантного аллелей в ткани опухоли,
- 3) исследование опухоли на наличие других значимых для патогенеза мутаций.

В ходе исследования не было выявлено потери нормального аллеля в опухоли, однако обнаружено полное отсутствие его экспрессии. Прочих значимых мутаций в опухоли не выявлено.

Заключение. Выявленный факт соблюдения двухударной модели канцерогенеза позволяет предполагать значимую роль мутации p.F1026L в гене *PBRM1* в развитии опухоли, однако отсутствие клинических проявлений у других носителей из данной семьи предполагает её низкую пенетрантность.

П12

Новая мутация в гене *CLN6* – основная причина нейронального цероидного липофусциноза 6 типа в Якутии: результаты таргетного экзомного секвенирования

П.И. Гурьева^{1*}, Д.А. Петухова¹, А.Л. Сухомясова^{1,2}, Е.Е. Гуринова², И.А. Николаева², Р.Н. Иванова², А.А. Кузнецов^{1,2}, В.С. Каймонов¹, М.Т. Саввина¹, Н.Р. Максимова¹

¹ ФГАУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова», г. Якутск, Россия;

² Медико-генетический центр ГАУ РС (Я) «Республиканская больница №1 – Национальный Центр Медицины», г. Якутск, Россия

*gurievapi@yandex.ru

Мотивация и цели. В медико-генетическом центре ГАУ РС (Я) «Республиканская больница №1 – Национальный Центр Медицины» на учете состоит несколько семей якутской этнической группы с подозрением на лейкодистрофию, генетическая причина которой не была установлена. Целью настоящей работы явился поиск молекулярно-генетической причины у больных с подозрением на лейкодистрофию с использованием таргетного экзомного секвенирования.

Методы. Исследовано 18 образцов ДНК детей и 24 образца ДНК их родственников из 17 семей с подозрением на лейкодистрофию. Проведено таргетное экзомное секвенирование с помощью панели TruSight Inherited Disease (Illumina, США) на генетическом секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Результаты анализа были валидированы с помощью прямого секвенирования по Сэнгеру. Далее была оптимизирована методика с применением ПЦР в режиме реального времени для диагностики нейронального цероидного липофусциноза 6 типа.

Результаты. При проведении данного исследования 8 пациентам из 6 семей установлен генетический диагноз

нейрональный цероидный липофусциноз 6 типа с аутосомно-рецессивным типом наследования (OMIM 601780), у которых нами обнаружена новая мутация c.396dupT в 4 экзоне гена *CLN6* в гомозиготном состоянии, приводящая к аминокислотной замене p.Val133fs (сдвиг рамки считывания). Родители больных являлись гетерозиготными носителями. Заболевание манифестировало в возрасте 3-4 лет. В клинической картине наблюдалась миоклоническая эпилепсия, атаксия, регресс психомоторного развития, деменция, нарушение зрения. На МРТ головного мозга перивентрикулярно выявлялись симметричные изменения в белом веществе полушарий головного мозга, атрофия червя и полушарий мозжечка.

Заключение. Таким образом, с помощью таргетного экзомного секвенирования выявлена новая мутация в гене *CLN6*, которая явилась причиной нейронального цероидного липофусциноза 6 типа, скрывавшейся под маской лейкодистрофии.

П13

Мутация в гене *KIAA2022* как причина эпилепсии и задержки психомоторного, речевого и интеллектуального развития у девочки

С.С. Жилина^{1,2}, Т.В. Кожанова^{1,2*}, Т.И. Мещерякова¹, Н.П. Прокопьева¹, К.В. Осипова¹, С.О. Айвазян¹, И.В. Канивец³, Ф.А. Коновалов⁴, Е.Р. Толмачева⁴, Ф.А. Кошкин⁴, А.Г. Притыко^{1,2}

¹ ГБУЗ «НПЦ спец.мед.помощи детям ДЗМ», Москва, Россия;

² ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, Россия;

³ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

⁴ ООО «Геномед», Москва, Россия

*TatyanaVK84@gmail.com

Мотивация и цели: описание случая выявления мутации в гене *KIAA2022* у девочки с криптогенной эпилепсией, задержкой психомоторного, речевого и интеллектуального развития.

Материалы и методы: клиническое обследование пациентки с криптогенной эпилепсией, задержкой психомоторного, речевого и интеллектуального развития. Проведено молекулярно-генетическое исследование: таргетное экзомное секвенирование генов, ассоциированных с наследственными формами эпилепсии и КФ-МЧ-ПЦР CAG-повтора 1 экзона гена AR для оценки инактивации X-хромосомы.

Результаты: X-сцепленная умственная отсталость (MIM 300260) – клинически и генетически гетерогенная группа наследственных заболеваний, обусловленных мутациями, локализованными на хромосоме X. Известны около 700 генов, связанных с умственной отсталостью, из них более 100 картированы на X-хромосоме, в том числе ген *KIAA2022*. В отделении психоневрологии НПЦ спец.мед.помощи детям наблюдается девочка 5 лет с эпилепсией, выраженной задержкой психомоторного, речевого и интеллектуального развития. Из анамнеза: ребенок от 1 беременности, наступившей после продолжительного периода бесплодия на фоне подготовки к ЭКО. Роды самостоятельные в срок, масса 3200 гр., рост 50 см, оценка по шкале Апгар 8/9. До 2-х лет развивалась по возрасту. С 2 лет регресс в психомоторном развитии, появились миоклонические приступы, гиперактивность, агрессивность в поведении, аутистические черты характера, отсутствие речи. При проведении таргетного экзомного секвенирования генов выявлена ранее не описанная гетерозиготная мутация в 3 экзоне гена *KIAA2022* – p.Asp451fs. Гемизиготные мутации в гене *KIAA2022* описаны у пациентов с X-сцепленной умственной отсталостью, тип 98 (OMIM: 300912), гетерозиготные мутации, нарушающие синтез полноразмерного белка, описаны как возникшие de novo у пациентов женского и мужского пола с эпилепсией и/или задержкой интеллектуального развития (de Lange I., 2016). Мутация не зарегистрирована в контрольных выборках «1000 геномов», ESP6500 и ExAC. При исследовании CAG-повтора 1 экзона гена AR неслучайная инактивация X-хромосомы не выявлена.

Заключение. Собственное клиническое наблюдение показывает, что мутации в гене *KIAA2022* могут быть также причиной эпилептической энцефалопатии и умственной отсталости не только у мальчиков, но и у девочек,

что имеет важное значение для определения тактики ведения пациента в отношении проведения генетического тестирования и медико-генетического консультирования.

П14

Острые лейкозы с перестройкой гена *KMT2A* у детей. Определение редких вариантов перестроек с использованием высокопроизводительного секвенирования

Е.А. Зеркаленкова^{1*}, А.Н. Казакова¹, К. Мейер², А.В. Панферова¹, Н.М. Тимофеева¹, Е.В. Апрельова¹, О.И. Солдаткина¹, П.Б. Барышев¹, Ю.Ю. Чекменева¹, Г.А. Цаур³, Р. Маршалек², М.А. Масчан¹, А.А. Масчан¹, Ю.В. Ольшанская¹

¹ ННПЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва

² Institut Pharmazeutische Biologie & DCAL, Frankfurt/Main

³ Областная детская клиническая больница № 1, Екатеринбург

*eazerkalenkova@gmail.com

Введение. Ген лизин-специфической метилтрансферазы 2A (*KMT2A*), расположенный в 11q23, вовлечен в большое количество транслокаций при ОЛ, при этом характером гена-партнера определяется различный прогноз заболевания.

Цель. Охарактеризовать группу пациентов с перестройками *KMT2A*. Определить спектр перестроек, найти редкие гены-партнеры.

Материалы и методы. Кариотипирование проводилось методом G-banding. Перестройка *KMT2A* определялась методом FISH; экспрессия транскрипта подтверждалась методом ПЦР в режиме реального времени. Структура химерного гена в случае редких перестроек определялись методом длинной инвертированной ПЦР с последующим секвенированием продукта с использованием высокопроизводительного секвенирования на приборе Illumina MiSeq после подготовки библиотек с реагентами NEBNext Ultra II (NEB).

Результаты. Всего зафиксировано 312 случаев пациентов с перестройкой гена *KMT2A* (возраст от 1 мес до 63 лет, медиана возраста 3 года). Больше половины случаев приходится на ОМЛ – 172 случая (55%). Наибольшее число ОЛ (как ОЛЛ, так и ОМЛ) приходится на пациентов в возрасте от 1 до 2 лет (55 случаев) и в возрасте от 9 до 15 лет (51 случай). Самой распространенной перестройкой в данной группе являлась *KMT2A-MLLT3* (28%). Среди других вариантов перестроек встречались: *KMT2A-MLLT10* (11,5%), *KMT2A-MLLT1* (7%), *KMT2A-ELL* (3,5%), *KMT2A-MLLT4* (3,5%). Кроме того, нами были проанализированы редкие варианты перестроек гена *KMT2A*. Мы охарактеризовали следующие редкие перестройки: *KMT2A-NEBL* (2 случая), *KMT2A-ABI1*, *KMT2A-ABI2*, *KMT2A-ARHGAP26*, *KMT2A-FLNA*, *KMT2A-CASC5*, *KMT2A-SEPT5* (по 1 случаю).

Выводы. В ходе настоящей работы была проанализирована группа пациентов с перестройкой гена *KMT2A*, и было найдено несколько редких генов-партнеров. Полученные данные позволяют проводить пациент-специфический мониторинг минимальной остаточной болезни, а также расширить данные о спектре перестроек гена *KMT2A* с целью дальнейшей классификации и функциональной характеристики генов-партнеров.

П15

Выявление редких химерных транскриптов в лейкоэмических клетках с помощью секвенирования транскриптома

А.Ю. Иконникова^{1*}, Ю.И. Амму², А.В. Снежкина¹, Г.С. Краснов¹, А.В. Кудрявцева¹, Т.В. Наседкина^{1,2}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, 119991, Москва

² Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, Москва, 119117

*anyuik@gmail.com

Мотивация и цели. Генетические нарушения при лейкозах часто приводят к образованию экспрессирующихся химерных генов, идентификация которых важна для диагностики и выбора терапии. Современные методы молекулярной диагностики, как правило, направлены на определение уже известных химерных генов. Для поиска новых и редких химерных генов в опухолевых клетках больных лейкозом эффективным подходом является высокопроизводительное секвенирование транскриптома.

Методы. Исследованы транскриптомы опухолевых клеток в образцах костного мозга пяти пациентов с острым миелобластным лейкозом (ОМЛ) и одного с миелодиспластическим синдромом (МДС). Подготовка библиотек для секвенирования включала выделение и фрагментацию тотальной РНК, синтез первой и второй цепи кДНК, лигирование адаптеров, полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Образцы подготовленных библиотек кДНК были отсекарованы на платформе Illumina (США) - HiSeq2000 парноконцевыми чтениями длиной по 100 п.о. Поиск химерных транскриптов выполнен при помощи приложения DeFuse. Для подтверждения результатов NGS использовали обратную транскрипцию-ПЦР и секвенирование по Сэнгеру.

Результаты. Редкие или ранее не описанные химерные транскрипты были выявлены в пяти образцах, в том числе, *OAZ1-PTMA*, t(2;19) и *MLLT10-GRIA4*, t(10;11); *ETV6-MDS1*, t(3;12) и *MN1-ETV6*, t(12;22); *MLL-SEPT6*, t(X;11). В образцах с нормальным кариотипом были обнаружены химерные транскрипты, образовавшиеся при слиянии генов, расположенных на одной хромосоме: *RP1-170019.22-HOXA10*, t(7;7) и *TFG-GPR128*, t(3;3). Продукты генов, вовлеченных в хромосомные перестройки, являются регуляторными белками, участвующими в репликации, транскрипции, передаче клеточных сигналов.

Заключение: Высокопроизводительное секвенирование является эффективным методом поиска редких и новых химерных транскриптов. Для выяснения роли обнаруженных нами химерных транскриптов в развитии заболевания и оценки их клинической значимости необходимы дальнейшие исследования.

П16

Влияние ошибок картирования прочтений NGS на спектр аллельных частот выявляемых вариантов

К.О. Карандашева^{1*}, А.С. Танас^{1,2}

¹ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

*christinavader@gmail.com

Мотивация и цели. При глубоком секвенировании целевых регионов в онкологическом исследовании, направленном на обнаружение минорного клона опухоли, значимыми могут оказаться генетические варианты, представленные различным соотношением аллельных частот, что диктует необходимость в разработке подходов, отличающих истинный генетический полиморфизм от ошибок секвенирования и ошибок картирования прочтений на референсный геном. При постановке исследования с использованием технологии Ion AmpliSeq существует возможность применения в качестве дополнительных данных информации о геномных координатах целевых регионов, а также о последовательности и длине используемых праймеров, что позволяет разработать критерии неправильного картирования и исключить такие прочтения из последующего анализа в соответствии с дизайном эксперимента. Целью данной работы является оптимизация процесса интерпретации результатов данных высокопроизводительного параллельного секвенирования посредством уменьшения количества ошибок выравнивания.

Методы. Работа проведена на данных, полученных на приборах Ion PGM и Ion S5 с использованием панелей различного дизайна и размера. Данные, картированные на референсную сборку генома, были представлены в виде файлов формата BAM. Методами статистического анализа была оценена значимость влияния ошибок выравнивания на спектр аллельных частот выявляемых генетических вариантов.

Результаты. Разработан алгоритм исключения неверно картированных прочтений, учитывающий данные о геномных координатах целевых регионов, проведены вычислительные эксперименты на реальных тестовых данных, позволяющие оценить эффективность его работы.

Заключение. Использование дополнительной информации при постановке исследования с использованием технологии Ion AmpliSeq позволяет исключить ошибочно картированные прочтения из анализа генетических вариантов, что существенно облегчает интерпретацию полученных данных.

П17

Разработка метода выявления клинически значимых структурных вариантов в генах *BRCA1* и *BRCA2* с использованием массового параллельного секвенирования в образцах ДНК, выделенной из крови и гистологических блоков

А.А. Кечин^{1,2*}, У.А. Боярских¹, Н.А. Ермоленко¹, Е.А. Храпов¹, А.С. Тюляндина³, Д.Г. Лазарева⁴, М.Л. Филипенко¹

¹ ФГБУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

² Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Российский онкологический научный центр им. Блохина, Москва, Россия

⁴ Алтайский филиал Российского онкологического научного центра им. Блохина, Барнаул, Россия

*a.a.kechin@gmail.com

Мотивация и цели. Генетические нарушения в генах *BRCA1* и *BRCA2* с высокой частотой (до 80%) ведут к развитию рака молочной железы (РМЖ) и/или рака яичников (РЯ). Высокую актуальность имеет разработка методов таргетного обогащения экзонов этих генов для выявления клинически значимых структурных вариантов с помощью NGS, что и стало целью данной работы.

Методы. ДНК была выделена из крови 175 пациентов больных РМЖ и РЯ, используя стандартные процедуры, включающие выделение и лизис мононуклеарных клеток периферической крови, гидролиз белков протеиназой К, очистку ДНК экстракцией примесей фенол-хлороформом и осаждение ДНК этанолом. Из гистологических блоков ДНК была выделена для 30 пациентов больных РЯ с применением щелочного лизиса и последующим выделением ДНК из осадка. Было разработано два метода приготовления библиотеки: с ампликонами разной длины (до 500 п.н.) и с ампликонами одинаковой длины (150 п.н.). Каждый из них включал в себя два этапа амплификации: (1) включение универсальных последовательностей; (2) введение индексирующих и адаптерных последовательностей. Анализ полученных данных проводили, используя разработанный нами протокол, объединенный в единый пакет с помощью Python.

Результаты. Разработанные методы приготовления библиотек показали покрытие всех выбранных ампликонов. Разработанный нами пакет для анализа данных был сравнен с другими подобными пакетами и показал более высокие результаты. Также в пакет была включена разработанная программа по вырезанию последовательностей праймеров из прочтений, которая показала большую применимость к таргетному секвенированию, чем программы сравнения. В целом, методы приготовления библиотеки и анализа данных показали высокие чувствительность и специфичность: 100% и 94,4%, соответственно.

Заключение. Нами разработана методика выявления мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* с помощью NGS, которая включает в себя приготовление библиотеки и обработку получаемых после секвенирования данных.

П18

Система детекции клональных перестроек иммуноглобулиновых генов для анализа минимальной остаточной болезни при терапии острых лимфобластных лейкозов

А.Ю. Комков^{1,2*}, А.М. Мирошниченкова¹, А.А. Минервина², Г.А. Нугманов², Ю.Б. Лебедев², И.З. Мамедов², Ю.В. Ольшанская¹, М.А. Масчан¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения Российской

Федерации, Москва

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академик М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

*alexandrkomkov@yandex.ru

Мотивация и цели. Под минимальной остаточной болезнью (МОБ) в онкогематологии понимают концентрацию лейкоэмических клеток, оставшихся в костном мозге или периферической крови пациента после терапии. При этом, уровень МОБ считается одним из сильнейших прогностических факторов, определяющих вероятность возникновения рецидивов при острых лимфобластных лейкозах (ОЛЛ). Целью данного исследования является разработка метода определения МОБ при ОЛЛ на основе таргетного массивированного секвенирования (NGS) перестроек генов T- и B-клеточных рецепторов в геномной ДНК из костного мозга.

Материалы и методы. Первичное выявление перестроек иммуноглобулиновых генов, специфичных для лейкоэмических клонов пациента, проводилось в геномной ДНК из костного мозга до лечения. Ампликоны для секвенирования были получены в 8 мультиплексных ПЦР с праймерами ко всем сочетаниям V-, D- и J-генов в локусах T- и B-клеточных рецепторов. Секвенирование осуществлялось на платформе Illumina MiSeq. Целевые перестройки определялись с помощью анализа их представленности в полученных репертуарах T- и B-клеточных рецепторов. Для дальнейшего анализа уровня МОБ использовалась ДНК из костного мозга пациентов на 36 день индукции. Библиотеки, содержащие целевые ампликоны, были получены в серии мультиплексных ПЦР с идентичным набором праймеров, специфичных к V-, D- и J-генам ранее выявленных перестроек, и суммарным количеством ДНК, эквивалентным 1 млн клеток. Секвенирование также осуществлялось на платформе Illumina MiSeq.

Результаты. С помощью описанного метода было проанализировано 29 инициальных образцов, в 27 из которых было суммарно идентифицировано 112 перестроек иммуноглобулиновых генов, специфичных для лейкоэмических клонов пациентов. Для 7 пациентов был проведен анализ МОБ.

Заключение. Использование перестроек иммуноглобулиновых генов для определения МОБ позволяет охватить до 95% случаев ОЛЛ, а способ их детекции на основе NGS обеспечивает наибольшую среди существующих методов точность и чувствительность.

П19

Биоинформатическая предобработка геномных данных полученных на различных платформах для последующего совместного использования в ассоциативных и индивидуальных исследованиях

Н.А. Кулемин^{1*}, О.В. Борисов^{1,2}, К.А. Бабалян^{1,2}, Э.В. Генерозов¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства»

² Московский Физико-Технический Институт (Государственный Университет)

*maveriksvao@gmail.com

Особый интерес среди современных генетических методик представляют ассоциативные исследования и применение их результатов на практике, но, зачастую, при задачах такого рода возникает вопрос объединения генетических данных, полученных на разных платформах или с использованием различных технологий. Кроме того, современные методы секвенирования нацелены в основном на поиск новых мутаций, отличных от референсного генома, однако при оценке риска в рамках мультипликативных моделей требуется информация о достоверности определения конкретного геномного состояния, в том числе и референсного. С другой стороны, отдельные платформы обладают технологическими особенностями, которые могут внести существенную ошибку при совместном анализе с результатами, полученными с помощью прочих технологий. В рамках проекта по

развитию персонализированной медицины в ФНКЦ ФХМ ФМБА России была проведена адаптация результатов секвенирования синтезом (Illumina, в том числе с использованием библиотек различных производителей), ионного полупроводникового секвенирования (Proton) и чип-генотипирования (Illumina iScan) для совместного использования в ассоциативных исследованиях, а также при индивидуальном анализе образца, для которого имеются данные, полученные с помощью нескольких платформ.

П20

Случай первичной аутосомно-рецессивной микроцефалии в Карачаево-Черкессии

А.Х. Макаов¹, А.В. Марахонов^{2,3*}, Т.А. Васильева², Е.Е. Тимковская², В.А. Галкина², Е.Л. Дадали², Р.А. Зинченко^{2,4}

¹ Муниципальное бюджетное лечебно-профилактическое учреждение «Хабезская центральная районная больница», Хабез Карачаево-Черкесской Республики, e-mail: makaov@yandex.ru

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»

⁴ Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, e-mail: renazinchenko@mail.ru

*marakhonov@gmail.com

Мотивация и цели. Первичная микроцефалия (ПМ) характеризуется уменьшением окружности головы более 3 стандартных отклонений (SD). Часто микроцефалия сопровождается задержкой психомоторного развития. В этиологии ПМ выделяют внешнесредовые и наследственные факторы. Наследственная ПМ является генетически гетерогенной группой нозологий, наследующихся преимущественно аутосомно-рецессивно. Описано около 15 различных генов, ассоциированных с ПМ. При наличии лицевых дизморфий дифференциальную диагностику в первую очередь проводят с синдромом Секкеля, с которым они образуют клинический континуум, а также с другими синдромами. В ходе генетико-эпидемиологического обследования населения Республики Карачаево-Черкессии выявлена черкесская семья с тремя сибсами (1 брат и 2 сестры) с тяжелой микроцефалией (<6 SD), низким ростом (<3–4 SD), характерными чертами лица (микрогнатия, клювовидный нос), тяжелой умственной отсталостью, без судорожных эпизодов в анамнезе. В семье есть также 2 здоровые сестры, одна из которых имеет здоровых детей. Пробандам был поставлен первичный диагноз синдрома Секкеля.

Методы. Ввиду высокой генетической гетерогенности ПМ ДНК-диагностика у одного из пробандов (брата) проводилась методом таргетного высокопроизводительного секвенирования (ВПС) клинически важных генов с последующим подтверждающим секвенированием по Сэнгеру. Популяционный скрининг проводился методом ПЦР-ПДРФ.

Результаты. В ходе ДНК-диагностики у пробанда выявлена гомозиготная мутация с.1386delC в 3 экзоне гена *ASPM*, приводящая к образованию преждевременного стоп-кодона p.Tyr462*. При секвенировании по Сэнгеру двух пораженных сибсов обнаружена та же мутация в гомозиготном состоянии. Гомозиготные и компаунд-гетерозиготные мутации в гене *ASPM* описаны у пациентов с аутосомно-рецессивной ПМ, тип 5 (OMIM: 608716). Здоровая сестра пробандов оказалась носителем этой мутации в гетерозиготном состоянии. Мутация не зарегистрирована в контрольных выборках, кроме того она не была обнаружена в выборке 101 здоровых черкесов (202 хромосомы).

Заключение. Использование современных методов ВПС позволило провести дифференциальную диагностику в семейном случае ПМ, идентифицировать патогенную мутацию и провести медико-генетическое консультирование в семье.

Исследование выполнено при частичной финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 15-04-01859, 17-04-00288 и РНФ 17-15-01051.

П21

Поиск мутаций при синдроме Марфана на основе метода массового параллельного секвенирования

О.Л. Миронович^{1*}, О.П. Рыжкова¹, А.Н. Семякина², А.В. Поляков¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва, Россия

² «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации обособленное структурное подразделение - научно-исследовательский клинический институт педиатрии, Москва, Россия

*mironovich_333@mail.ru

Введение. Синдром Марфана (МФС) – аутосомно-доминантное системное заболевание соединительной ткани с преимущественным поражением сердечно-сосудистой системы, опорно-двигательного аппарата и органа зрения. За развитие МФС ответственны мутации в гене фибриллина-1 – *FBN1*. Ген *FBN1* – большой комплексный ген, протяженностью в 200 т.п.н, в связи с чем стандартный метод исследования прямым секвенированием по Сэнгеру является довольно дорогим. В основе разработанной системы использованы принципы технологии MPS, которые были переработаны и оптимизированы для диагностики синдрома Марфана. Целью работы являлась разработка системы поиска мутаций в гене *FBN1* на основе метода MPS.

Материалы и методы. Образцы ДНК 10 неродственных пробандов с направляющим диагнозом «синдром Марфана» исследованы на наличие мутаций во всех экзонах и экзон-интронных соединениях гена *FBN1*. Секвенирование проводилось на платформе Roche/454 Life Sciences. При создании «библиотеки» фрагментов ДНК введен дополнительный этап амплификации с использованием праймеров с флуоресцентной меткой. Включение данного этапа в систему диагностики позволило количественно оценить амплификацию всех необходимых фрагментов, обеспечив секвенирование 100% последовательности гена *FBN1*.

Результаты и обсуждение. В результате секвенирования образцов ДНК десяти пациентов, у двоих пациентов обнаружены патогенные мутации в гене *FBN1* в гетерозиготном состоянии. Одна замена оказалась мутацией сайта сплайсинга - с.2728+3A>G, вторая миссенс-мутацией - с.7754T>C (p.Ile2585T). Выявленные изменения последовательности ДНК проверены методом прямого автоматического секвенирования по Сэнгеру.

Заключение. Разработанная система поиска мутаций в гене *FBN1* пригодна для применения в клинической практике. Однако она оказалась достаточно сложной и трудоемкой и по своим характеристикам сопоставима с системами других производителей, что ставит вопрос о целесообразности ее применения.

П22

Роль NGS в преимплантационной диагностике (ПГД) хромосомных и моногенных нарушений у эмбрионов, полученных при ЭКО

Е.В. Мусатова^{1,2}, Я.В. Софронова¹, Е.А. Померанцева^{1*}

¹ ООО ЦГРМ Genetico

² Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр»

*e.pomerantseva@gmail.com

Мотивация и цели.

1. Провести сравнение результатов хромосомного скрининга эмбрионов методами NGS и aCGH.

2. Продемонстрировать на примерах особенности ПГД-консультирования в случаях, когда молекулярная диагностика заболевания в семье была выполнена при помощи NGS.

Методы. Для проведения хромосомного скрининга методом aCGH были использованы наборы 24sure и 24sure+ (Illumina). Для проведения хромосомного скрининга методом NGS были использованы наборы Veriseq (Illumina). Гаплотипирование методом фрагментного анализа было выполнено на секвенаторе ABI3130XL.

Результаты. Проанализировано 4000 образцов. У пациентов исследуемой выборки (средний возраст 37 лет) 53,7% эмбрионов имеют хромосомные аномалии. Различия выявляемости патологии между методами aCGH и NGS было обнаружено только для мозаичных аномалий. Изолированный мозаицизм был выявлен у 3% эмбрионов методом aCGH и у 12% методом NGS, что может говорить, как о большей чувствительности метода NGS, так и о его меньшей специфичности. При моногенной ПГД необходимо принимать решение о том, достаточно ли убедительно показана каузативность мутации. Этот вопрос более сложен в случаях, когда молекулярная диагностика была выполнена при помощи NGS. Наш опыт показывает, что заключения лабораторий о статусе патогенности мутации сделаны с применением значительно отличающихся алгоритмов. В нескольких случаях каузативность мутации была поставлена под сомнение или опровергнута, и ПГД признана невозможной. В некоторых неоднозначных случаях дополнительный функциональный анализ выявленной мутации позволил сделать заключение о возможности ПГД.

Заключение. ПГД с применением методов ПЦР, aCGH, NGS позволяет успешно провести диагностику эмбрионов и одновременно выявить как хромосомные, так и моногенные нарушения. Лаборатория ПГД должна самостоятельно оценивать достаточность доказательств каузативности мутации. Для интерпретации применяются биоинформатический анализ, анализ литературы и баз данных, анализ сегрегации в семье, функциональный анализ.

П23

Молекулярно-генетическая характеристика ОМЛ с t(8;21) у детей

А.В. Панферова*, М.В. Гаськова, Н.М. Тимофеева, О.И. Солдаткина, Ю.Ю. Чекменева, Е.А. Зеркаленкова, А.Н. Казакова, И.И. Калинина, Ю.В. Ольшанская, Г.А. Новичкова, М.А. Масчан, А.А. Масчан

ННПЦ детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева, Москва

*a.panfyorova@gmail.com

Мотивация и цели. CBF-ОМЛ (от англ. «core binding factor» острый миелоидный лейкоз) включает ОМЛ с t(8;21) (q22;q22) и inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22) хромосомными перестройками, приводящими к образованию *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11* химерных генов, соответственно. CBF-ОМЛ составляют 25% детских и 15% взрослых de novo ОМЛ. Выявление характерных для данного типа ОМЛ цитогенетических маркеров имеет принципиальное значение для определения тактики ведения пациентов. Считается, что CBF-ОМЛ имеют хороший прогноз относительно других подтипов ОМЛ, лечение с использованием высоких доз цитарабина привело к значительно лучшим показателям выживаемости. Тем не менее, в 40% случаев происходят рецидивы заболевания, что свидетельствует о клинической гетерогенности этой группы. С момента первого описания t(8;21) и inv(16) ОМЛ в 1973 и 1983, реарранжировки генов *RUNX1* и *CBFB* хорошо изучены и известно, что экспрессия *RUNX1-RUNX1T1* и *CBFB-MYH11* химерных протеинов недостаточна для индуцирования фульминантной формы лейкоза. По этой причине *CBF-ОМЛ* считаются классической моделью развития патогенеза в результате кооперации нескольких событий: нарушения нормальной функции транскрипционных факторов (таких как CBF-комплекс), влияющих на дифференцировку, и возникновение активирующих мутаций, которые увеличивают клеточную пролиферацию. Доказательством этой модели является факт наличия дополнительных мутаций в генах *KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*, активирующих внутриклеточные сигнальные пути с участием тирозинкиназ, они часто встречаются при обоих подтипах CBF-ОМЛ. Определить и охарактеризовать спектр мутаций у детей в группе CBF-ОМЛ

с t(8;21) явилось основной целью исследования.

Методы. 26 инициальных образцов костного мозга пациентов с ОМЛ t(8;21) были исследованы методом высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina. Для подготовки библиотек использовали набор TruSight Myeloid Sequencing Panel (Illumina, США), секвенирование осуществляли на приборе MiSeq (Illumina, США) по параметрам, установленным производителем. Первичный и вторичный анализ данных, аннотацию вариантов также проводили с помощью программного обеспечения Illumina: MiSeq Reporter Software и VariantStudio Variant Analysis Software v2.2.

Результаты. Проанализированы результаты обследования 26 детей, 14-ти девочек и 12-ти мальчиков (медиана возраста - 137 месяцев), у пяти из которых (19%) имел место рецидив заболевания. В этой группе 25 пациентов имели как минимум 1 мутацию, остальные 2, 3 и 4, у пациентки с диагнозом ОМЛ t(8;21), ЦНС IV, миелоидная саркома спинномозгового канала было выявлено 6 мутаций. Среди всех проанализированных генов наиболее часто мутации встретились в группе генов семейства рецепторов тирозинкиназы (*KIT*, *FLT3* и *N/KRAS*). 11 пациентов имели мутации в гене *NRAS*, 3 – в *KRAS*. Мутации в гене *KIT* встретились у 3 (11,5%) пациентов, тогда как в литературе описана частота порядка 17%-41%. Мутации в гене *FLT3* были представлены 1 мутацией *TKD* и двумя *FLT3 ITD*. Кроме того, мутации в генах, ответственных за эпигенетическую регуляцию (*ASXL1*, *KDM6A*, *EZH2*, *BCORL1*, *BCOR*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*) и когезинового комплекса (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) найдены у 11 пациентов, чаще определялись мутации в гене *EZH2* (у троих пациентов). Таким образом, 11 (42%) пациентов имели дополнительные мутации в генах эпигенетической регуляции и когезинового комплекса.

Заключение. Частота выявления мутаций в генах семейства рецепторов тирозинкиназы в нашем исследовании совпадает с опубликованным ранее данными, кроме того, с аналогичной высокой частотой в этой группе обнаружены мутации в генах, ответственных за эпигенетическую регуляцию. Эти данные являются диагностически значимыми, так как негативное влияние на прогноз, в том числе у больных с благоприятными цитогенетическими аномалиями, оказывают активирующие мутации III класса тирозинкиназ *KIT* и *FLT3*. Использование высокопроизводительного секвенирования позволило выявить мутации в генах, включенных в систему диагностики детских ОМЛ для стратификации по группам риска в том числе и у пациентов с низким содержанием бластной популяции (20%-30%), что ранее с использованием секвенирования по методу Сэнгера было невозможным.

П24

Опыт применения комплексной молекулярно-генетической диагностики нейтрофиброматоза

М.С. Пашенко^{1*}, Е.Б. Кузнецова^{1,2}, А.С. Танас^{1,3}, Л.А. Бессонова¹, Г.Н. Матющенко¹, Н.А. Демина¹, В.А. Галкина¹, М.С. Петухова¹, И.В. Анисимова¹, Д.В. Залетаев^{1,2,3}, В.В. Стрельников^{1,3}

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», г. Москва, Россия

² Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

*chaplygina.90@mail.ru

Мотивация: оценить эффективность разработанного комплексного подхода к молекулярно-генетической диагностике нейтрофиброматоза.

Цели работы:

- У пациентов с клиническими признаками нейрофиброматоза осуществить поиск мутаций генов *NF1* и *NF2* с помощью NGS.
- Провести верификацию выявленных мутаций с помощью метода секвенирования по Сэнгеру.
- Провести анализ количества копий генов *NF1* и *NF2* в ДНК крови пациентов с использованием MLPA.

Методы: высокопроизводительное параллельное секвенирование (NGS), мультиплексная лигазозависимая амплификация (MLPA).

Результаты. В результате скрининга мутаций в генах *NF1* и *NF2* методом секвенирования нового поколения в выборке из 244 больных, изменения обнаружены в 47,1% случаев.

В гене *NF1* определено 103 мутации – 38 нонсенс-мутаций, 22 миссенс-мутации, 23 мутации сдвига рамки считывания, 20 мутаций сайта сплайсинга. В гене *NF2* найдено 12 мутаций - 6 нонсенс-мутаций, 4 миссенс-мутации, 2 мутации сдвига рамки считывания.

Методом MLPA выявлены делеции в гене *NF1* у 14 из 120 пациентов. Делеции включали один или несколько экзонов, либо захватывали весь ген.

Методом секвенирования по Сэнгеру проведена верификация выявленных мутаций у больных и членов их семей. В 7 семьях обнаружены молекулярные нарушения, унаследованные пробандом от одного из родителей.

Заключение. В настоящей работе совокупность двух высокотехнологичных методов позволила охватить полный спектр генетических нарушений у больных с нейрофиброматозом. Однако, при использовании данных методов частота выявленных мутаций в образцах оказалась существенно ниже по сравнению с результатами зарубежных коллег. Мы предполагаем, что это может быть обусловлено, во-первых, значительным количеством пациентов раннего возраста с минимальными клиническими признаками, вероятно, без генетической патологии. Во-вторых, нельзя исключать наличие в исследуемой выборке пациентов с генетическими заболеваниями, симптомы которых аналогичны таковым при нейрофиброматозе.

P25**Анализ мутаций в гене *EGFR* в циркулирующей ДНК крови у пациентов с немелкоклеточным раком легкого**

Е.Е. Писарева*, Е.В. Горностаева, С.П. Коваленко, В.А. Шаманин

¹ ФГБНУ «НИИ молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск

*katerina.pisareva@mail.ru

Мотивация и цели. Ранее было показано, что анализ циркулирующей ДНК (цДНК) из крови обладает 100% специфичностью и 70-93% чувствительностью при анализе мутаций *EGFR* по сравнению с анализом ДНК из опухолевого материала у пациентов с немелкоклеточным раком легкого (НМРЛ). Это позволяет использовать цДНК крови для неинвазивной клинической диагностики с целью поиска мутаций в *EGFR*, являющихся маркерами чувствительности к тирозинкиназным ингибиторам (ТКИ). Рецидив НМРЛ связан с появлением в опухоли других мутаций *EGFR*, ассоциированных с резистентностью к ТКИ. Эти мутации определяются в цДНК за несколько месяцев до появления визуальных признаков прогрессирования опухоли. Целью работы является разработка методики секвенирования гена *EGFR* в цДНК у пациентов с НМРЛ на приборе Ion Torrent PGM.

Методы. Секвенирование 19-21 экзонов гена *EGFR* на Ion Torrent PGM с использованием собственной методики подготовки библиотеки.

Результаты. Проводили анализ 53 образцов цДНК крови от пациентов с НМРЛ, для которых был известен статус *EGFR* в опухолевом материале, и 5 контрольных ДНК с 8 наиболее частыми мутациями в 19-21 кодонах *EGFR*, включая делецию в 19 экзоне. Была разработана методика создания библиотеки ампликонов, включающая праймеры для таргетной амплификации 19-21 экзонов *EGFR* и способ присоединения адаптеров для секве-

нирования на платформе Ion Torrent. В результате секвенирования 58 образцов среднее покрытие ампликона составило 18463 (от 2706 до 89282). Один из образцов цДНК имел низкое среднее покрытие 161 и был исключен из дальнейшего анализа. Среди 52 образцов цДНК крови было выявлено 12 и 10 случаев мутаций *EGFR*, ассоциированных с чувствительностью и резистентностью к ТКИ соответственно. Анализ контрольных образцов показал, что такая методика секвенирования имеет чувствительность около 1% аллеля с мутацией в образце.

Заключение. Секвенирование нового поколения на приборе Ion Torrent PGM может быть использовано для диагностики мутаций *EGFR* в цДНК из крови у пациентов с НМРЛ.

P26**Поиск герминальных мутаций в генах *SDHX* при каротидных хемодектомах методом высокопроизводительного секвенирования**

А.В. Снежкина¹, Д.В. Калинин², А.Р. Зарецкий³, А.Л. Головюк², М.С. Федорова¹, Е.А. Жевелюк¹, О.А. Степанов^{1,4}, Г.С. Краснов¹, А.В. Кудрявцева^{1,4*}

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт хирургии имени А.В. Вишневского Минздрава России, Москва, Россия

³ ООО «Евроген Лаб», Москва, Россия

⁴ Национальный медицинский исследовательский радиологический центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

*rhizamoeba@mail.ru

Мотивация и цели. Параганглиомы головы и шеи являются редкими нейроэндокринными опухолями. Наиболее частой является каротидная хемодектома, локализуемая в области бифуркации сонной артерии. До 40% всех параганглиом обусловлены наследственными генетическими нарушениями в ряде генов. Герминальные мутации в генах, кодирующих субъединицы фермента сукцинатдегидрогеназы (*SDHx*) являются одними из наиболее частых при параганглиомах и связаны с более агрессивным течением заболевания.

Методы. С помощью набора Nextera Rapid Capture Exome (Illumina) подготовлены библиотеки 32 опухолевых образцов (NextSeq 500 (Illumina), PE 75+75). Для определения принадлежности мутаций в генах *SDHx* к соматическим или герминальным проведено секвенирование по Сэнгеру образцов ДНК, выделенной из крови.

Результаты. С помощью высокопроизводительного секвенирования обнаружены мутации в генах *SDHx* в 9 из 32 образцов (4 - *SDHD*, 3 - *SDHB*, 2 - *SDHC*). Герминальные мутации подтверждены в 8 случаях из 9. В одном образце мутация в гене *SDHB* оказалась соматической.

Заключение. Секвенирование экзона опухолевых тканей каротидных хемодектом, позволило выявить герминальные мутации в генах *SDHx* с вероятностью 89%. Эти опухоли в настоящее время перестали считаться доброкачественными, так как накапливается информация о случаях агрессивного течения заболевания. Это вызывает необходимость изучать генетические особенности опухолей для поиска потенциально эффективным таргетных препаратов, а также для оценки степени агрессивности опухоли. С этой целью рекомендовано, прежде всего, секвенирование соматического экзона. По-видимому, наиболее эффективным алгоритмом генетического тестирования каротидных хемодектом является секвенирование соматического экзона с последующей верификации конкретных мутаций в генах, кодирующих субъединицы сукцинатдегидрогеназы, а также ряда других генов, в ДНК крови методом секвенирования по Сэнгеру.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 16-04-01521) и гранта ICGB CRP/RUS15-01.

П27

Молекулярно-генетические основы семейных аденом гипофиза (АГ)

Т.С. Тарасова*, Е.А. Пигарова, Л.К. Дзеранова, А.Н. Тюльпаков, И.И. Дедов

ФГБУ «Эндокринологический научный центр» МЗ РФ

*Tarasova.TatianaS@gmail.com

Мотивация и цели. Перспективно внедрение технологий высокопроизводительного параллельного секвенирования. Проводится молекулярно-генетического и генотип-фенотипического анализа у пациентов с семейными АГ.

Методы. Обследовано 30 пациентов (19 (63%) мужчин и 11 (37%) женщин) с семейными АГ различного типа секреции. Пациентов с соматотропинами было 24, пролактиномами – 2, кортикотропинами – 2, неактивными АГ – 2. Данным пациентам выделена ДНК с использованием набора MagNA Pure LC DNA Isolation Kit I, создана панель генов (*MEN1*, *CDKN1B*, *PRKAR1A*, *GNAS*, *AIP*, *SDHA*, *SDHB*, *SDHC*, *SDHD*, *PRKCA*, *CDKN2C*, *CDKN2A*, *POU1F1*, *PTTG2*) с помощью программы Ion AmpliSeq™ Designer, проведено высокопроизводительное параллельное секвенирование на секвенаторе Ion Torrent™ PGM™ (Thermo Fisher Scientific – Life Technologies, США).

Результаты. АГ с преобладающим типом секреции соматотропины (n=24) чаще выявлялись у мужчин, чем у женщин (15М:9Ж). Медиана возраста пациентов составила 45 лет [19-82]. Средний рост для мужчин 185,6 см [160-224], для женщин – 169,7 см [150-199]. Максимальный уровень СТГ в дебюте заболевания составил 513 нг/мл, а ИРФ-1 – 1517 нг/мл. По МРТ головного мозга чаще визуализировались макроаденомы гипофиза с максимальным размером опухоли 39 мм, с распространением более чем в двух направлениях. Представителям 20 семей из 30 проведено генетическое исследование с помощью вышеуказанной панели генов: у 2 пациентов с соматотропинами были выявлены мутации гена *AIP* p.R271W и p.A411GfsX47, у 1 пациента были выявлены полиморфизмы с недоказанным патологическим значением в гене *SDHA* p.V589V, также у 1 пациента с фенотипом синдрома МакКьюн-Олбрайта в гене *SDHB* была выявлена гетерозиготная замена p.S163P. Остальные результаты в работе, требуют дальнейшего анализа.

Заключение. Выявлено преобладание мужского пола среди пациентов с семейными АГ, что противоположно ситуации при спорадических формах заболевания. В 20% пациентов выявлены генетические изменения.

П28

Часто встречаемые мутации в генах саркомерных белков у пациентов с гипертрофической кардиомиопатией из БеларусиН.Н. Чакова¹*, С.С. Ниязова¹, С.М. Комиссарова²¹ Институт генетики и цитологии НАН Беларуси² Республиканский научно-практический центр «Кардиология»

*n.chakova@igc.by

Мотивация и цели. Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) – наследственное заболевание миокарда, характеризующееся высоким риском внезапной сердечной смерти. Целью исследования являлся поиск частых мутаций в генах, кодирующих саркомерные белки, у пациентов с ГКМП в Беларуси.

Методы. В исследование были включены 12 пациентов с ГКМП с высоким риском внезапной сердечной смерти. Пробоподготовку образцов осуществляли с использованием набора TruSight Cardio Sequencing Kit (Illumina). Секвенирование проводили на приборе MiSeq (Illumina).

Основные результаты. Выявлены ранее описанные в литературе мутации, характерные для ГКМП: R663C (rs397516127) в гене *MYH7*, R154H (rs104893749) в гене *MYL3*; а также замены, ассоциируемые с ГКМП: R346H (rs397515883) в гене *MYBPC3*, Y162C в гене *MYH7* и N282S (rs759156523) в гене *ACTC1*. Также обнаружена не описанная ранее делеция 3412delC в гене *MYBPC3*, приводящая к сдвигу рамки считывания R1138fs. Некото-

рые мутации встретились более чем один раз. У 2 пациентов выявлено сочетание замен E1265V (rs730880607) и C1266R (rs730880608) в гене *MYBPC3*. Подобный случай описан у американского пациента, нуждающегося в пересадке сердца. У 2 пациентов в этом же гене определена мутация W1214R, которая обнаружена у 1 пациента в нашем предыдущем исследовании, а также в голландской и индийской популяциях. В гене *MYBPC3* установлена также замена R326Q (rs34580776) с невыясненной диагностической значимостью у 1 пациента в данном исследовании и у 1 – в предыдущем. У 1 пациента выявлена мутация A729P в гене *MYH7*. Эта мутация ранее зарегистрирована нами в 3 неродственных семьях и российскими учеными – у 3 пробандов. Кроме того, ранее в 2 семьях мы обнаружили мутацию E924K (rs121913628) в гене *MYH7*. Но самой частой оказалась замена Q1233X (rs397516037) в гене *MYBPC3*, она встретилась у 5 неродственных пациентов из Беларуси.

Заключение. Выявлены часто встречающиеся замены у пациентов с ГКМП из Беларуси: A729P (4 пациента из 166) и E924K (2 из 161) в гене *MYH7*; R326Q (2 из 28), Q1233X (5 из 90), W1214R (3 из 90) и комбинация E1265V+C1266R (2 из 90) в гене *MYBPC3*.

П29

Анализ спектра мутаций в гене PAH методом NGS у новорожденных с положительными результатами неонатального скрининга на фенилкетонурию

Ю.А. Чурюмова*

Санкт-Петербургское государственное казенное учреждение здравоохранения «Диагностический центр (медико-генетический)»

*chury.yuliya@gmail.com

Фенилкетонурия (ФКУ) – моногенное заболевание, обусловленное нарушением аминокислотного обмена, приводящее к тяжелому поражению ЦНС. В связи с высокой распространенностью (1:8000) в РФ с 1970-1980х годов проводится неонатальный скрининг на ФКУ. В Санкт-Петербурге с апреля 2015 г. в качестве подтверждающей диагностики после биохимического скрининга проводится исследование гена *PAH* методом NGS.

В период с апреля 2015 г. по январь 2017 г. среди 74 обследованных с повышенными уровнями фенилаланина было выявлено 44 новорожденных с 2 патогенными мутациями и 20 – с 1 мутацией. При этом в 48% случаев была обнаружена мутация R408W в гомозиготном и гетерозиготном состоянии, в 10% – частые мутации (IVS10-11G>A, R252W, IVS12+1G>A, R261Q) и в 41% случаев – редкие мутации, в том числе в 2 случаях ранее не описанные миссенс-мутации: g.103234189T>A, g.103249096G>T.

Таким образом, высокий процент (41%) выявленных редких мутаций подтверждает диагностическую эффективность применения NGS в неонатальном скрининге ФКУ. Данное исследование лежит в основе проспективного изучения и внедрения NGS в лаборатории неонатального скрининга.

П30

Выявление генетических полиморфизмов, связанных с наследственной мигренью в семье татарского происхожденияЕ.И. Шагмарданова¹*, Е.Г. Менделевич², С.Ф. Хайбуллина¹, Е.В. Мартынова¹, А.А.Ризванов¹, А.В. Никитин³, О.А. Гусев¹, Р.А. Гиниатуллин⁴¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия² Казанский государственный медицинский университет, Казань, Россия³ ФГБУ ФНКЦ ФМБА России, Москва, Россия⁴ Департамент нейробиологии, Университет Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия

*rjuka@mail.ru

Мигрень – распространенное заболевание головного мозга, характеризующееся интенсивной головной болью и, зачастую, другими симптомами (тошнота, рвота и др.). Различают мигрень без ауры и мигрень с аурой, разновидностью которой является семейная гемиплегическая мигрень (Familial hemiplegic migraine (FHM)). Этот тип мигрени является редким вариантом, для которого достаточно хорошо изучен механизм и найден ряд ассоциированных генов.

В данном исследовании был проведен полноэкзомный анализ 6 членов семьи, у 2х из которых диагностирована гемиплегическая мигрень и у двух мигрень с аурой. Еще два родственника являются здоровыми. Тотальная ДНК была выделена из образцов цельной крови, полученной от пациентов. Исследование было одобрено этическим комитетом КФУ и получено информированное согласие каждого пациента. Экзомное обогащение проводилось с помощью NimbleGen EzCap Human v3.0 Exome Enrichment Kit (Roche) с дальнейшим секвенированием на платформе HiSeq2500 (Illumina) в режиме парноконцевого чтения с длиной рида 100 п.о.

Была обнаружена патогенная мутация p.Arg583Gln (NM_023035.2:c.1748G>A) в гене *CACNA1A* у пробанда и его дочери, которая является редкой известной мутацией, вызывающей гемиплегическую мигрень. Родственники пробанда (брат и сын), страдающие мигренью с аурой не имеют данной мутации. Носительство этой мутации часто, но не во всех случаях связано с мозжечковой атаксией. В данном случае у двух пациентов – пробанда и его дочери наблюдается мозжечковая атрофия.

Таким образом, генетический анализ показал наличие редкой мутации p.Arg583Gln в гене *CACNA1A* ассоциированной с наследственной мигренью, у двух членов семьи, которая может объяснить более тяжелое течение заболевания по сравнению с другими больными членами семьи. Кроме того, мы выявили ряд неописанных гетерозиготных несинонимичных мутаций специфичных для больных членов семьи. Их возможная роль в патогенезе должна быть предметом дальнейшего изучения.

Данное исследование является пилотным по изучению мутаций, ассоциированных с семейной формой мигрени у населения с татарским этносом.

П31

Пример диагностики редких моногенных синдромов с помощью секвенирования экзома нового поколения (NGS)

И.В. Шаркова^{1*}, Е.Л. Дадали¹, И.А. Акимова¹, Ф.А. Коновалов², И.В. Канивец²

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

² Лаборатория «Геномед», Москва

*sharkova-inna@rambler.ru

Цель: описание клинико-генетических характеристик двух редких моногенных синдромов, диагностированных с помощью NGS.

Методы. NGS проводилось на платформе IlluminaNextSeq 500 с применением методики таргетного обогащения ДНК TruSightOne V1.1.

Результаты. Первый больной, 5-летний мальчик с сочетанием задержки речевого развития, аутизма и умеренных дизморфических черт строения лица и нижних конечностей в виде широкой вдавленной переносицы, бульбовидной формы носа, эпиланта, деформации пальцев стоп, гипертрихоза в области высокого лба и спины. При проведении NGS выявлена мутация c.1868A>C (p.Tyr623Cys) в гетерозиготном состоянии в гене *SOX5*, ответственном за возникновение синдрома Ламб-Шафферас аутосомно-доминантным типом наследования (OMIM:616803). Наличие выявленной мутации у пробанда подтверждено секвенированием по Сенгеру. У родителей данной мутации выявлено не было, что свидетельствовало о ее происхождении de novo. У второго больного, 3-летнего мальчика, также отмечалось сочетание грубой задержки психо-речевого развития с дизморфическими чертами в виде, глазного гипертелоризма,птоза левого века, длинного фильтра, макростомии, макро-

глоссии, диспластичных ушных раковин, широкой шеи, воронкообразной деформации грудной клетки, фетальных подушечек на пальцах кистей, редких тонких волос. На МРТ головного мозга: агенезия мозолистого тела, центрэнцефалическая киста на уровне передних рогов боковых желудочков, ретроцеребеллярная киста. При проведении NGS предположено наличие у больного делеции участка хромосомы 6q25, которая подтверждена хромосомным микроматричным анализом. Показано, что в область делеции попадает ген *ARID1B*, ответственный за развитие синдрома Коффина-Сирикс тип 1 (OMIM:135900), клиническая картина которого совпадала с таковой у пробанда.

Заключение: представленные случаи демонстрируют эффективность использование NGS для диагностики редких наследственных синдромов, обусловленных как мутациями в отдельных генах, так и микроструктурными перестройками хромосом.

П32

Генетические особенности *BRCA1-2* не ассоциированного наследственного рака молочной железы/ рака яичников у женщин с татарским этносом

Л.Х. Шигапова^{1*}, Я.А. Лексина¹, М.Г. Гордиев², Р.Ф. Еникеев², А.Г. Никитин³, Е.И. Шагмарданова¹, О.А. Гусев⁴

¹ Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

² ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» МЗ РТ, Казань, Россия

³ ФГБУ ФНЦ ФМБА России, Москва, Россия

⁴ RIKEN, Йокогама, Япония

*shi-leyla@yandex.ru

На долю наследственно-обусловленного РМЖ приходится от 5 до 10 % случаев заболевания, наследственный РЯ встречается с частотой 15-20%. Наследственный РМЖ/ РЯ обусловлен не только герминальными мутациями в генах *BRCA1* и *BRCA2*, но и мутациями в других генах репараций.

Основной целью данной работы является исследование мутационного профиля пациентов с не *BRCA1-2* ассоциированным наследственным РМЖ/РЯ, принадлежащие к татарскому этносу.

У пациенток с наследственными РМЖ/РЯ анализировался следующий список генов: *TP53, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, EPCAM, APC, MUTYH, CDKN2A, CDK4, ATM, KIT, PDGFRA, CDH1, CTNNA1, PRSS1, BRCA1, BRCA2, SPINK1, FANCI, FANCL, PALB2, RAD51B, RAD51C, RAD54L, RAD51D, CHEK1, CHEK2, CDK12, BRIP1, PPP2, R2A, BARD1, PARP1, STK11, XRCC3*.

Обогащение ДНК целевых генов проводили с помощью панели NimbleGen SeqCap EZ Choice (Roche) с последующим секвенированием на платформе Miseq, Illumina в режиме парноконцевого чтения с длиной рида 250 п.о..

В исследуемую группу вошли 84 женщины с наследственным РМЖ, 57 женщины с наследственным РЯ и 31 женщина без патологий (контрольная группа). Выбор участников исследования ограничивался следующими критериями: татарское происхождение, семейный анамнез (в случае наличия заболевания), отсутствием патогенных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Возраст участников исследования был 25-82 года.

У больных РМЖ/РЯ были обнаружены генетические нарушения в генах *CDH1, MUTYH, CHEK2, FANCI, MSH2* и др. Распределение обнаруженных патогенных и предположительно патогенных мутаций представлено в таблицах. В образцах контрольной группы мутаций обнаружено не было.

Ген	Количество мутаций у пациентов	
	PMЖ	РЯ
<i>CHEK2</i>	4	1
<i>CDH1</i>	2	1
<i>MUTYH</i>	2	2
<i>FANCI</i>	1	2
<i>MSH</i>	1	-
<i>RAD51C</i>	-	1

Распределение предположительно патогенных мутаций.

Ген	Количество мутаций у пациентов	
	PMЖ	РЯ
<i>APC</i>	7	-
<i>ATM</i>	2	-
<i>PALB2</i>	2	-
<i>FANCI</i>	1	-
<i>BARD1</i>	1	-
<i>CHEK2</i>	3	1
<i>CDK12</i>	-	3
<i>TP53</i>	-	1
<i>MUTYH</i>	-	1
<i>CDK11</i>	-	1

Результаты проведенных полногеномных исследований позволили подтвердить влияние мутаций в генах репарации (не BRCA1-2) на патогенез наследственного PMЖ и РЯ.

ОПУБЛИКОВАННЫЕ ТЕЗИСЫ

T01

Роль NGS в мониторинге микробиома респираторного тракта больных муковисцидозом

О.Л. Воронина¹, Н.Н. Рыжова¹, М.С. Кунда¹, Е.И. Аксенова^{1*}, Н.Е. Шаропова¹, Е.Л. Амелина², А.Г. Чучалин², А.Л. Гинцбург¹

¹ ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

² НИИ пульмонологии ФМБА России, Москва, Россия

*eaksenova@list.ru

Мотивация и цели. В патогенезе моногенного заболевания муковисцидоз (МВ) ключевую роль играет инфицирование респираторного тракта. Контролю подлежат, прежде всего, протеобактерии. Однако использование NGS в анализе микробиома дыхательной системы в 2010-х гг показало необходимость мониторинга таксономического разнообразия бактерий, снижение которого и является первымстораживающим признаком, свидетельствующим о нарастании дезинтегрированного воспалительного процесса в отделах респираторного тракта. Целью настоящего исследования было изучение ответа микробиома отделов респираторного тракта взрослых пациентов с МВ на проводимую терапию.

Методы. Образцы мокроты и лаважа параназальных пазух пациентов, хронически инфицированных протеобактериями, анализировали с помощью массового параллельного секвенирования генов рРНК на платформе MiSeq Illumina.

Результаты. Анализ образцов 10 пациентов в процессе проводимого лечения показал, что только для двух из них длительная комплексная терапия привела к оздоровлению микробиома легких. Не только резкое сокращение протеобактерий и рост доли фирмикут, но прежде всего, увеличение бактериоидов и актинобактерий (но не микобактерий), а также рост разнообразия внутри последних таксонов были характерны для образцов указанных пациентов. Активация мукоцилиарного транспорта вследствие применения Калидексо у одного из пациентов способствовала элиминации оставшихся протеобактерий, что привело к некоторому росту доли протеобактерий в мокроте, но доля бактериоидов и актинобактерий, а также общее таксономическое разнообразие в этом образце остались высокими. Исследование параназальных пазух других пациентов показало, что уровень протеобактерий в микробиоме этого отдела существенно выше, чем в легких.

Заключение. Увеличение таксономического разнообразия микробиома отделов респираторного тракта свидетельствует об эффективности проводимой терапии. Параназальные пазухи пациентов с МВ подлежат постоянному мониторингу, как потенциальный резервуар инфекции.

T02

Наследственная спастическая параплегия в выборке российских пациентов

В.А. Кадникова^{*}, О.П. Рыжкова, Г.Е. Руденская, А.В. Поляков

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медино-генетический научный центр», Москва.

*vkadnikova@gmail.com

Наследственные спастические параплегии (НСП, SPG) – гетерогенная группа нейродегенеративных болезней с преимущественным поражением пирамидного тракта, их ведущим или единственным симптомом, является прогрессирующий нижний спастический парез, проявляющийся нарушением ходьбы вплоть до ее утраты.

В генетическом спектре преобладают аутосомно-рецессивные формы SPG, но более частыми являются доми-

нантные (АД) – за счет SPG4 и SPG3, к которым приводят мутации в генах *SPAST* и *ATL1* соответственно. В совокупности две эти формы ответственны за ~50% случаев АД НСП.

С 2002 года нами были собраны ДНК 73-х неродственных пробандов (46 - семейных случаев, 27 - спорадических) с клинической симптоматикой НСП. ДНК 56 (76,7%) пробандов были проанализированы на наличие мутаций в гене *SPAST* методом секвенирования, и 20 (27,4%) – в гене *ATL1* (некоторые пациенты имели оба входящих диагноза). Пациенты без мутаций были проанализированы методом MLPA-анализа, который идентифицирует протяженные делеции и дупликации в обоих генах.

В результате анализа было обнаружено 19 (26%) мутаций в гене *SPAST* и 8 (11%) в гене *ATL1*. Полученные результаты отличаются от литературных данных для гена *SPAST* (48% - Канада) и сопоставимы с таковыми для *ATL1* (18% - Венгрия). Таким образом, мутации были найдены для 37% пациентов, что значительно меньше, чем в других популяциях (Канада – 64%, Германия - 65%, Венгрия – 68%). Полученные данные указывают на необходимость изучения других форм SPG.

Благодаря внедрению метода массового параллельного секвенирования (МПС) было открыто порядка 30 новых форм и генов ответственных за их возникновение. Существуют разные МПС технологии, однако секвенирование панелей заболевания имеет некоторые преимущества благодаря сниженной стоимости и более легкой интерпретации данных. Нами была разработана панель для идентификации всех известных на данный момент форм НСП. В ближайшее время мы планируем проанализировать пациентов без мутаций в генах *SPAST* и *ATL1* с помощью данной панели.

Т03

Разработка экспериментальных методик высокопроизводительного секвенирования древней ДНК и методов анализа данных

А.Д. Мацвай^{1,2}, И.Э. Альборова¹, Е.В. Пимкина², М.Л. Маркелов³, К.Ф. Хафизов^{1,2*}, Х.Х. Мустафин¹

¹ ФГАУВПО Московский физико-технический институт (государственный университет), Долгопрудный, Россия

² ФБУН Центральный НИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия.

³ ФГБНУ «НИИ медицины труда», Москва, Россия

*kkhafizov@gmail.com

Задачами исследования являлись разработка протокола выделения ДНК из археологического образца (аДНК), пробоподготовки к эксперименту NGS, создание программного конвейера для анализа и интерпретации полученных данных.

Как материал для исследования были выбраны зубы черепа с раскопок захоронения начала XVII в.

Процессы пробоподготовки и выделения ДНК проводились в специально созданном модуле, обеспеченном системой вакуумирования и наполнения азотом высокой чистоты, что позволило свести к минимуму интра-лабораторную контаминацию.

Выделенная ДНК представляла собой пул фрагментов длиной от 25 до 500 пар оснований. Концентрация аДНК была менее 0,5 нг/мл, что обусловило невозможность пробоподготовки к NGS стандартными методами. Получить библиотеку фрагментов, пригодную для секвенирования, удалось только с использованием модифицированных адаптеров, не позволяющих формирование адаптер-димерных структур. Секвенирование проводилось на платформе Illumina MiSeq.

Идентификация организмов осуществлялась выравниваем отдельных прочтений программой BLAST на БД NCBI. Около трети всех прочтений удалось идентифицировать – последовательности были отнесены к 3,500 различным видам из 1,500 родов. При этом основная часть прочтений принадлежали организмам родов *Streptomyces* и *Bradyrhizobium* (почвенные бактерии) – около 22% всех идентифицированных последовательностей. Большинство идентифицированных прочтений (~9%) оказались отнесенными к видам *Ralstonia solanacearum* и *Homo sapiens* (~5%).

Наиболее качественное выравнивание на референсную последовательность генома человека удалось получить с использованием алгоритма BWA-backtrack. При этом было картировано только ~1,5% сырых прочтений, однако на каждую из хромосом, а также на последовательность мтДНК человека, пришлось по несколько тысяч прочтений.

Т04

Использование полноэкзомного секвенирования в ДНК-диагностике первичной цилиарной дискинезии

С.А. Руднева^{*}, Е.Е. Брагина, В.Б. Черных

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Медико-генетический научный центр», Москва

*sveta_a_r@mail.ru

Первичная цилиарная дискинезия, ПЦД (Primary ciliary dyskinesia, PCD, MIM#244400) – гетерогенная группа аутосомно-рецессивных и X-сцепленных рецессивных заболеваний, обусловленных дефектами строения и функций ресниччатого аппарата. Мужчины с ПЦД страдают бесплодием из-за суб-/тотальной астенозооспермии. Использование электронной микроскопии сперматозоидов (ЭМИС) позволяет обнаруживать различные аномалии ультраструктуры аксонемы и других компонентов жгутика (динеиновых ручек, радиальных спиц, центральных микротрубочек) и является важным диагностическим тестом.

В составе аксонемы и примыкающих к ней структур обнаружено более 250 различных белков. В связи с этим до появления методов секвенирования нового поколения (NGS) проведение ДНК-диагностики, такого высокогетерогенного наследственного заболевания, как ПЦД, являлось достаточно сложной задачей и имело невысокую эффективность. В обычной врачебной практике и сейчас зачастую проводится лишь анализ мажорных мутаций 2 генов *DNAI1* и *DNAH5*, кодирующих белки наружных динеиновых ручек аксонемы. Однако, только за последние 5 лет использования NGS технологий были описаны мутации более 30 генов, вызывающих нарушения в строении жгутиков сперматозоидов. Ультраструктурные дефекты, вызванные КЗ мутациями этих генов, приведены ниже:

- **белки тяжелой, средней и легкой цепей динеиновых ручек** (*DNAH5*, *DNAI1*, *DNAI2*, *DNAL1*, *NME8*, *TXNDC3*, *DNAH11*); стыкочные белки внешних динеиновых ручек (*CCDC114*, *ARMC4*, *CCDC151*), цитоплазматические факторы сборки динеина (*DNAAF1*, *DNAAF2*, *DNAAF3*, *HEATR2*, *LRR6*, *ZMYND10*, *DYX1C1*, *SPAG1*, *CCDC103*, *C21ORF59*)
- **внешние динеиновые ручки** (*OFD1*, *RPGR*), клинически значимые (КЗ) мутации в которых приводят к дефектам динеиновых ручек;
- **белки радиальных спиц** (*RSPH4A*, *RSPH9*, *RSPH4A*), КЗ мутации в которых приводят к дезорганизации центральной пары микротрубочек, дефектам нексиновых мостиков, внутренних динеиновых ручек;
- **белки нексиновых мостиков** (*CCDC39*, *CCDC40*), КЗ мутации в которых приводят к их отсутствию; белка центральной пары микротрубочек (*HYDIN*), КЗ мутации в котором приводят к отсутствию центральной пары микротрубочек;
- **регуляторные белки** (*CCNO*, *MCIDAS*), КЗ мутации в которых вызывают цилиарную аплазию.

Преимущества полноэкзомного секвенирования (ПЭС) заключаются в создании новых подходов в молекулярно-генетической диагностике на основе анализа всех возможных генов, в том числе недавно обнаруженных, отсутствующих в клинических (таргетных) генных панелях. Все опубликованные результаты вновь обнаруженных мутаций, связанных с ПЦД, полученные с помощью NGS технологий, свидетельствуют о том, что его использование существенно (до 70-80%) повышает результативность выяснения молекулярно-генетических причин данного заболевания. Мы полагаем, что ПЭС может быть рекомендовано в качестве основного метода исследования при молекулярно-генетической диагностике ПЦД.

T05

Опыт применения NGS-секвенатора Genereader Qiagen в клинико-исследовательской практике для выявления соматических мутаций**В.М. Сафронова¹, А.В. Коровкина², Т.В. Тимошенко², Л.Н. Любченко¹**¹ Лаборатория клинической онкогенетики ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ² ООО «ИнтерЛабСервис»

*vera.svm@gmail.com

Мотивация и цели. ДНК, полученная из парафиновых блоков (FFPE), высоко фрагментирована, поэтому в работе оценивалось качество и количество ДНК на каждом этапе. Проанализировать образцы ДНК разных нозологий с помощью NGS секвенирования. Подобрать условия выделения ДНК для работы с набором, выявляющим мутантную последовательность, даже если ее доля составляет 1% от популяции ДНК дикого типа.

Методы. Единая система секвенирования GeneReader включает в себя полностью совместимые и интегрированные станции, наборы реагентов для всех этапов проведения исследования: выделение ДНК, создание библиотек ДНК, контроль качества библиотек, секвенирование, анализ, интерпретация полученных результатов.

- Секвенатор GeneReader Qiagen
- QIAcube Qiagen — система для выделения ДНК и подготовки проб
- QIAxcel Qiagen — система капиллярного гель-электрофореза для проверки качества библиотеки
- QIAexpert Qiagen — спектрофотометр
- Прибор для проведения эмульсионной ПЦР Qiagen (этап амплификации приготовления библиотеки)
- Компьютер, совместимый с облачной системой обработки полученных данных
- Панель для целевого обогащения GeneRead Actionable Insight Tumor Panel

Результаты. Проанализировано 10 образцов по 12 генам: *KRAS, NRAS, KIT, BRAF, PDGFRA, ALK, EGFR, ERBB2, PIK3CA, ERBB3, ESR1, RAF1*. РМЖ – 2 образца, РЯ – 1 образец, рак почки – 2 образца, рак предстательной железы – 1 образец. Для каждого образца выявлено не менее 10 мутаций клинически значимых и непатогенных. Заключение. Качество и количество ДНК с каждым этапом наращивалось и улучшалось, что повысило результат, относительно других методов работы с ДНК, выделенной из парафиновых блоков. Удалось проанализировать образцы из парафиновых блоков, где были нарушены этапы преаналитики и пробоподготовки. Выявленные мутации помогли с постановкой диагноза, что обуславливает клиническую значимость метода и набора.

T06

Особенности применения технологии NGS в HLA-типировании как первый шаг к успешной трансплантации ГСК**О.А. Шрагина^{*}, В.В. Захарова, Е.В. Райкина**

ФГБУ «ННПЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России.

*olga.shragina@mail.ru

Введение. HLA-типирование – важный этап для пациента на пути к трансплантации костного мозга. Точность и скорость его выполнения влияют на возможность поиска неродственного донора и, как следствие, оказание своевременной помощи больному.

Пациентка П. с ранее диагностированным ОМЛ-М5 потупила в клинику с рецидивом заболевания (97% бластных клеток в костном мозге). Планировалось проведение гаплоидентичной трансплантации костного мозга (от матери пациентки).

Методы. HLA-типирование пациентки и потенциального донора проводилось методами:

- NGS (NGSgo, GenDX, платформа MiSeq)

- Секвенирование по Сенгеру (SBT, SeCore Sequencing Kit, Invitrogen)
- Аллельспецифичная ПЦР с последующей детекцией в агарозном геле (SSP HLA Typing Kits, Olerup)

Результаты. По результатам типирования методами NGS и SBT пациентка являлась гомозиготой по всем исследованным локусам и имела генотип: A*02:01- B*18:01-C*07:01- DRB1*11:04- DQB*03:01. По результатам типирования матери пациентки (A*03:01,26:01- B*35:03,56:01-C*12:03,01:02- DRB1*11:01,07:01- DQB*03:01,03:03) не было выявлено общего гаплотипа у дочери и матери. (Родственная связь была подтверждена анализом STR.) Дополнительное типирование пациентки методикой SSP обнаружило второй гаплотип (Bw6): A*03:01- B*35:03-C*12:03- DRB1*11:01- DQB*03:01. Результаты повторного типирования после уменьшения количества бластных клеток (до 33%): NGS показал тот же гомозиготный результат; при проведении SBT на фореze появились небольшие пики второго аллеля.

Заключение. Нами были обнаружены: нормальные клетки, содержащие оба HLA-гаплотипа; малигнизированные клетки, утратившие один из гаплотипов. Потеря гетерозиготности части или целого HLA-гаплотипа ранее описана как соматическая мутация. Этот случай показывает, что изменение генотипа малигнизированных клеток (клональная соматическая мутация) может привести к ошибке при проведении тестирования. Все гомозигонные результаты должны быть подтверждены методикой SSP, повторным анализом буккального соскоба, типированием родителей.

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Freimer N.B.19	Бахарев В.А.7	Глотов А.С.15	Иванова Р.Н.28	Корвиго И.9	Масчан М.А. 30, 32, 36
Gress A.19	Баязудинова Г.М.22	Глушкова М.А.27	Иконникова А.Ю.30	Корнева Ю.С.21	Матющенко Г.Н.37
Jasinska A.J.19	Бессонова Л.А.23, 37	Гнетецкая В.А.23	Иллариошкин С.Н.18	Корнилов Н.В.27	Мацвай А.Д.46
Nekrutenko A.10	Близнец Е.А. П.23	Головюк А.Л.39	Иткис Ю.С.12	Коровкина А.В.48	Мейер К.30
Sejersen T.16	Борисов О.В.24, 33	Гольцов А.Ю.7	Кадникова В.А.45	Костарева А.А.16	Менделевич Е.Г.41
Service S.K.19	Боярских У.А.32	Гордиев М.Г.25, 43	Казакова А.Н.30, 36	Кочеткова Т.О.7	Мещерякова Т.И.29
Sjoberg G.16	Брагин А.Г.27	Горностаева Е.В.38	Каймонов В.С.28	Кошкин Ф.А.29	Милованова Н.В.12
Warren W.C.19	Брагин А.О.25	Губанова Н.В.25	Калинин Д.В.39	Краснов Г.С.30, 39	Минервина А.А.32
Wilson R.K.19	Брагина Е.Е.47	Гуринова Е.Е.28	Калинина И.И.36	Крылова Т.Д.12	Миронович О.Л.23, 35
Абнизова И.И.26	Бровкина О.И.25	Гурьева П.И.28	Калинина О.В.9	Кудрявцева А.В.30, 39	Мирошниченкова А.М.32
Абрамов И.С.21	Васильев Г.В.26	Гусев О.А. 25, 41, 43	Калинченко Н.Ю.7	Кузнецов А.А.28	Мукосей И.С.7
Абрамычева Н.Ю.18	Васильев Е.В.7	Дадали Е.Л.	Каменец Е.А.12	Кузнецова Е.Б.13, 37	Мусатова Е.В.35
Айвазян С.О.29	Васильев Р.В.27 11, 17, 21, 34, 42	Канбекова О.Р.8	Кулемин Н.А.24, 33	Мустафин Х.Х.46
Акимова И.А.21, 42	Васильева Т.А.34	Дедов И.И.40	Канивец И.В.29, 42	Кунда М.С.45	Наседкина Т.В.21, 30
Аксенова Е.И.45	Васичкина Е.С.16	Демина Н.А.37	Карандашева К.О.13, 31	Курцер М.А.7	Немцова М.В.13
Алексеева Е.А.13, 14	Вершинина Т.Л.16	Дзеранова Л.К.40	Каретникова Н.А.7	Лавров А.В.17	Никитин А.В.41
Альборова И.Э.46	Внучкова Ю.А. П.27	Дружков М.О.25	Кекеева Т.В.13	Лазарева Д.Г.32	Никитин А.Г. П.25, 43
Амелина Е.Л.45	Володин И.В.27	Емельянова М.А.21	Кечин А.А.32	Лебедев И.Н.8	Николаева И.А.28
Аммур Ю.И.30	Воронина О.Л.45	Еникеев Р.Ф.25, 43	Ким Л.В. Д.7	Лебедев Ю.Б.32	Ниязова С.С.40
Анисимова И.В.37	Высоцкий А.Ю.7	Ермоленко Н.А. П.32	Кириллова К.И.13	Левченко О.А.17	Новичкова Г.А.36
Аношкин К.И.13, 27	Вялова Н.В.22	Жевелюк Е.А.39	Киселев А.М.16	Лексина Я.А.43	Нугманов Г.А.32
Апрелова Е.В.30	Вяткина С.В.27	Жигалина Д.И.8	Клюшина А.А.16	Лисица Т.С.21	Ольшанская Ю.В. ... 30, 32, 36
Артюхова В.Г.8	Вяхирева Ю.В.19	Жилина С.С.29	Князева А.А.16	Любченко Л.Н.48	Орлов Ю.Л.25, 26
Афанасьев А.9	Галиева Э.Р.26	Заклязьминская Е.В.15	Ковалев С.С.25	Макаов А.Х.34	Осипова К.В.29
Бабалян К.А.24, 33	Галкина В.А. 23, 34, 37	Залетаев Д.В. 13, 14, 37	Коваленко С.П.38	Максимова Н.Р.28	Павлов А.Е.27
Бабенко В.Н.25	Гаськова М.В.36	Зарецкий А.Р.39	Кожанова Т.В.29	Мамедов И.З.32	Панферова А.В.30, 36
Бабенко О.В.14	Генерозов Э.В.24, 33	Захарова В.В.48	Козлова В.М.14, 27	Марахонов А.В.20, 34	Пащенко М.С.13, 37
Барбитов Ю.А.15	Гиниатуллин Р.А.41	Захарова Е.Ю.12	Колодкина А.А.7	Маркелов М.Л.46	Первунина Т.М.16
Барков И.Ю.7	Гинцбург А.Л.45	Зеркаленкова Е.А.30, 36	Комиссарова С.М.40	Маркова Т.Г.23	Петров В.М.7
Барышев П.Б.30	Глинкина Ж.И.7	Зинченко Р.А.34	Комков А.Ю.32	Мартынова Е.В.41	Петухова Д.А.28
			Коновалов Ф.А.	Маршалек Р.30	Петухова М.С.37
		 21, 23, 29, 42	Масчан А.А.30, 36	Пигарова Е.А.40

Пимкина Е.В.	46	Скрябин Н.А.	8	Филатова А.Ю.	19
Писарева Е.Е.	38	Сломинский П.А.	18	Филипенко М.Л.	32
Поляков А.В.		Снежкина А.В.	30, 39	Хайбуллина С.Ф.	41
.....	6, 22, 23, 35, 45	Солдаткина О.И.	30, 36	Хафизов К.Ф.	46
Померанцева Е.А.	35	Софронова Я.В.	35	Ходырев Д.С.	25
Предеус А.В.	15	Степанов О.А.	39	Храпов Е.А.	32
Притыко А.Г.	29	Стрельников В.В. ...	13, 14, 37	Худяков А.А.	16
Прокопьева Н.П.	29	Стрижова М.А.	27	Цаур Г.А. П.	30
Прошлякова Т.Ю.	12, 13	Ступко О.К.	7	Чакова Н.Н.	40
Пьянков Д.В.	21	Сухомясова А.Л.	28	Чекменева Ю.Ю.	30, 36
Райкина Е.В.	48	Танас А.С.	13, 14, 31, 37	Черных В.Б.	47
Раменский В.Е.	9, 19	Тарасова Т.С.	40	Чурюмова Ю.А.	41
Ризванов А.А.	41	Тарновская С.И.	16	Чучалин А.Г.	45
Рубцов П.М.	7	те Боекхорст Р.	26	Шагимарданова Е.И.	
Руденская Г.Е.	45	Тетруашвили Н.К.	7	25, 41, 43
Руднева С.А.	47	Тимковская Е.Е.	34	Шадрина М.И.	18
Рыжкова О.П.		Тимофеева Н.М.	30, 36	Шаманин В.А.	38
.....	6, 23, 35, 45	Тимошенко Т.В.	48	Шарапова Н.Е.	45
Рыжова Н.Н.	45	Толмачева Е.Р.	29	Шаркова И.В.	21, 42
Саакян С.В.	14	Трофимов Д.Ю.	7	Шигапова Л.Х.	25, 43
Саввина М.Т.	28	Троценко И.Д.	7	Шистерова О.А.	21
Сафронова В.М. Т.	48	Тюльпаков А.Н.	7, 40	Шрагина О.А. Т.	48
Семячкина А.Н.	35	Тюляндина А.С.	32	Шубина Е.	7
Сергушичев А.А.	16	Федорова М.С.	39	Шульская М.В.	18
Серебрякова Е.А.	15	Федотов В.П.	32	Цагина О.А.	22
Симакова Т.С.	27	Федотова Е.Ю.	18	Юдина Е.В.	23
Скоблов М.Ю.	9, 19, 20	Федюшкина И.В.	24	Юсупов Р.	12

